

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. Januar 2004 (15.01.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/005504 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 9/90, 15/82

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/007027

(22) Internationales Anmeldedatum: 2. Juli 2003 (02.07.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität: 102 30 220.0 4. Juli 2002 (04.07.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): SUNGENE GMBH & CO. KGAA [DE/DE]; Corrensstr. 3, 06466 Gatersleben (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SONNEWALD, Uwe [DE/DE]; Am Hange 6, 06484 Quedlinburg (DE). BÖRNKE, Frederik [DE/DE]; Am Heiligen Brunnen 2, 06484 Quedlinburg (DE). HERBERS, Karin [DE/DE]; Am Hange 6, 06484 Quedlinburg (DE). TSCHIERSCH, Bettina [DE/DE]; Ballstr. 26a, 06484 Quedlinburg (DE). NEUHAUS, Horst-Ekkehard [DE/DE]; Im Braumentstück 13, 67659 Kaiserslautern (DE).

(74) Anwalt: PRESSLER, Uwe; c/o BASF Aktiengesellschaft, 67056 Ludwigshafen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht
— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

536887
021209

WO 2004/005504 A1

(54) Title: METHODS FOR OBTAINING PATHOGEN RESISTANCE IN PLANTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM ERREICHEN EINER PATHOGENRESISTENZ IN PFLANZEN

(57) Abstract: The invention relates to methods for creating or increasing pathogen resistance in plants by preferably pathogen-inducible expression of a sucrose isomerase.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung einer Pathogenresistenz in Pflanzen durch - bevorzugt pathogeninduzierbare - Expression einer Saccharoseisomerase.

KO

(DS)

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 0000053687	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03/07027	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 02/07/2003	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 04/07/2002
Anmelder SUNGENE GMBH & CO.. KGAA		

Dieser Internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser Internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der Sprache ist die Internationale Recherche auf der Grundlage der Internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der Internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der Internationalen Anmeldung offenbarten Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz ist die Internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

in der Internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der Internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses Internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

wie vom Anmelder vorgeschlagen

weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

keine der Abb.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/07027

A. KLASSEFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N9/90 C12N15/82

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 02 27003 A (KUNZ MARKWART ; MATTES RALF (DE); SUEDZUCKER AG (DE); VOGEL MANFRED) 4. April 2002 (2002-04-04) Seite 14, Zeile 5 - Zeile 13 ---	8, 9, 11-15
X	BOERNKE FREDERIK ET AL: "Potato tubers as bioreactors for palatinose production" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, Bd. 96, Nr. 1, 13. Juni 2002 (2002-06-13), Seiten 119-124, XP002259504 ISSN: 0168-1656 das ganze Dokument ---	8, 9, 11-15
X	WO 01 59136 A (IPK INST FUER PFLANZENGENETIK ; SONNEWALD UWE (DE); BOERNKE FREDERIK) 16. August 2001 (2001-08-16) Beispiel 6 ---	8, 9, 11-15
	-/-	

 Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem Internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche	Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts
28. Oktober 2003	13/11/2003
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Kania, T

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 95 20047 A (KLEIN KATHRIN ;KUNZ MARKWART (DE); MATTES RALF (DE); SUEDZUCKER AG) 27. Juli 1995 (1995-07-27) ----	
A	WO 01 59135 A (IPK INST FUER PFLANZENGENETIK ;SONNEWALD UWE (DE); BOERNKE FREDERI) 16. August 2001 (2001-08-16) ----	
A	ROCHA-SOSA M ET AL: "BOTH DEVELOPMENTAL AND METABOLIC SIGNALS ACTIVATE THE PROMOTER OF A CLASS I PATATIN GENE" EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 8, Nr. 1, 1989, Seiten 23-29, XP002038303 ISSN: 0261-4189 Seite 28, linke Spalte, letzter Absatz ----	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/07027

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 0227003	A	04-04-2002	DE	10047286 A1	04-04-2002
			AU	7639801 A	08-04-2002
			CA	2421618 A1	19-03-2003
			WO	0227003 A1	04-04-2002
			EP	1322772 A1	02-07-2003
WO 0159136	A	16-08-2001	DE	10006462 A1	13-09-2001
			AU	3547401 A	20-08-2001
			WO	0159136 A1	16-08-2001
			EP	1272645 A1	08-01-2003
WO 9520047	A	27-07-1995	DE	4414185 C1	07-09-1995
			AU	1155495 A	27-07-1995
			AU	688848 B2	19-03-1998
			AU	1534995 A	08-08-1995
			BR	9500271 A	17-10-1995
			CA	2140613 A1	20-07-1995
			DE	4447471 A1	31-08-1995
			DE	4447472 A1	14-09-1995
			WO	9520047 A2	27-07-1995
			EP	0740706 A1	06-11-1996
			FI	950187 A	20-07-1995
			FI	962891 A	18-07-1996
			JP	7250693 A	03-10-1995
			NO	950194 A	20-07-1995
			US	2003087416 A1	08-05-2003
			US	5786140 A	28-07-1998
			US	5985622 A	16-11-1999
WO 0159135	A	16-08-2001	DE	10045113 A1	16-08-2001
			AU	3546001 A	20-08-2001
			WO	0159135 A1	16-08-2001
			EP	1263971 A1	11-12-2002
			US	2003159181 A1	21-08-2003

516075

PCT/EP2003/007027



Translation

INTERNATIONAL COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 0000053687	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/EP2003/007027	International filing date (day/month/year) 02 July 2003 (02.07.2003)	Priority date (day/month/year) 04 July 2002 (04.07.2002)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 9/90		
Applicant SUNGENE GMBH & CO. KGAA		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>2</u> sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 18 December 2003 (18.12.2003)	Date of completion of this report 20 September 2004 (20.09.2004)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International Application No.
PCT/EP 93/07027

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

This report refers to the international search report citations. The numbering (D1-D6) corresponds to the sequence in which the documents appear in the search report.

Subject matter of the invention

The invention relates to the expression of sucrose isomerase in transgenic plants under the control of epidermis-specific or pathogen-inducible promoters. The plants show a reduced susceptibility to pathogens, in particular fungi and nematodes.

Novelty and inventive step (PCT Article 33)

The prior art hitherto does not show a connection between the recombinant expression of sucrose isomerase, the formation of non-cariogenic sugars, such as, for example, palatinose, in transgenic plants, and an increase in the resistance to pests. Consequently, novelty and inventive step are acknowledged for the methods of claims 1-7 and for the expression cassettes and transgenic organisms of claims 8-15.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 0000053687	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03/07027	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 02.07.2003	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 04.07.2002
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N9/90		
Anmelder SUNGENE GMBH & CO. KGAA, et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.

2. Dieser BERICHT umfasst insgesamt 4 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
 Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).
Diese Anlagen umfassen insgesamt 2 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:
 - I Grundlage des Bescheids
 - II Priorität
 - III Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
 - IV Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
 - V Begründete Feststellung nach Regel 66.2 a)ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
 - VI Bestimmte angeführte Unterlagen
 - VII Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
 - VIII Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 18.12.2003	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 20.09.2004
Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Kania, T Tel. +49 89 2399-7703



1. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):

Beschreibung, Seiten

1-61 in der ursprünglich eingereichten Fassung

Sequenzen, Seiten

1-50 in der ursprünglich eingereichten Fassung

Ansprüche, Nr.

1-15 eingegangen am 12.08.2004 mit Schreiben vom 09.08.2004

Zeichnungen, Blätter

1/8-8/8 in der ursprünglich eingereichten Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um:

- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- Beschreibung, Seiten:

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03/07027

Ansprüche, Nr.:
 Zeichnungen, Blatt:

5. Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen.)

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung
Neuheit (N) Ja: Ansprüche 1-15
Nein: Ansprüche
Erfinderische Tätigkeit (IS) Ja: Ansprüche 1-15
Nein: Ansprüche
Gewerbliche Anwendbarkeit (IA) Ja: Ansprüche 1-15
Nein: Ansprüche:

2. Unterlagen und Erklärungen:

siehe Beiblatt

Dieser Bericht bezieht sich auf die im Internationalen Recherchenbericht aufgeführten Dokumente. Die Nummerierung (D1-D6) entspricht ihrer Reihenfolge im Recherchenbericht.

Gegenstand der Erfindung

Die Erfindung beschreibt die Expression von Saccharoseisomerase in transgenen Pflanzen unter Kontrolle von epidermis-spezifischen bzw. pathogen-induzierbaren Promotoren. Die Pflanzen zeigen daraufhin eine verringerte Anfälligkeit gegenüber Pathogenen, insbesondere Pilzen und Nematoden.

Neuheit und erfinderische Tätigkeit (Artikel 33 PCT)

Ein Zusammenhang zwischen der rekombinanten Expression von Saccharoseisomerase, der Bildung nicht-kariogener Zucker, wie z.B. Palatinose, in transgenen Pflanzen und einer Erhöhung der Resistenz gegenüber Schädlingen ist im Stand der Technik bislang unbekannt.

Aufgrund dessen können Neuheit und erfinderische Tätigkeit für die Verfahren der Ansprüche 1-7, sowie die Expressionskassetten und transgenen Organismen der Ansprüche 8-15 anerkannt werden.

Geänderte Patentansprüche

1. Verfahren zum Erzielen oder Erhöhen der Resistenz gegen mindestens ein Pathogen in pflanzlichen Organismen; wobei nachfolgende Arbeitsschritte umfasst sind
 - 5 a) transgene Expression eines Proteins mit Saccharoseisomerase Aktivität in einem pflanzlichen Organismus oder einem Gewebe, Organ, Teil oder Zelle desselben, und
 - 10 b) Auswahl der pflanzlichen Organismen, bei denen - im Unterschied oder Vergleich zum Ausgangsorganismus - die Resistenz gegen mindestens ein Pathogen besteht oder erhöht ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Saccharose-Isomerase beschrieben wird durch
 - 15 i) ein Protein gemäß SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 oder 36, oder
 - ii) ein funktionelles Äquivalent zu einem Protein gemäß SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 oder 36, oder
 - iii) ein funktionell äquivalentes Fragment zu einem Protein gemäß i) und ii).
- 20 3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei die Expression der Saccharoseisomerase gewährleistet wird durch eine transgene Expressionskassette umfassend mindestens eine Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
 - 25 a) Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 oder 36, und
 - b) Nukleinsäuresequenzen kodierend für Proteine mit einer Homologie von mindestens 40% zu der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 oder 26 aufweisen, und
 - c) Nukleinsäuresequenzen gemäß SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 30 21 oder 35, und
 - d) Nukleinsäuresequenzen, die zu einer Nukleinsäuresequenz von c) degeneriert ist, und
 - e) Nukleinsäuresequenzen, die eine Homologie von mindestens 40% zu einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 35 oder 35 aufweisen, und
 - f) Nukleinsäuresequenzen, die mit einem komplementären Strang der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 oder 35 hybridisieren.
- 40 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Saccharose-Isomerase unter Kontrolle eines in Pflanzen funktionellen pathogen-induzierbaren oder gewebespezifischen Promoters exprimiert wird.

0817/427/2002 Ko

09.08.2004

Geänderte Ansprüche Vers. 2

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Pathogen ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Pilzen und Nematoden.
- 5 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Pathogen ausgewählt ist aus der Gruppe der Pilze bestehend aus Plasmodiophoromycota, Oomycota, Ascomycota, Chytridiomyceten, Zygomyceten, Basidiomycota und Deuteromyceten.
- 10 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Pflanze ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Kartoffel, Rübe, Zuckerrübe, Tomate, Banane, Karotte, Zuckerrohr, Erdbeere, Ananas, Papaya, Soja, Hafer, Gerste, Weizen, Roggen, Triticale, Hirse und Mais.
- 15 8. Transgene Expressionskassette enthalten in funktioneller Verknüpfung mit einem in Pflanzen funktionellen pathogen-induzierbaren Promotor eine Nukleinsäuresequenz kodieren für eine Saccharose-Isomerase.
- 20 9. Transgene Expressionskassette nach Anspruch 8, wobei die Saccharoseisomerase wie in einem der Ansprüche 2 oder 3 definiert ist.
10. Transgene Expressionskassette nach Anspruch 8 oder 9, wobei der pathogen-induzierbare Promotor ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 23, 24, 32, 33 oder 34.
- 25 11. Transgener Expressionsvektor enthaltend eine transgene Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10.
- 30 12. Transgener Organismus enthaltend eine transgene Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10 oder einen transgenen Expressionsvektor gemäß Anspruch 11.
13. Transgener Organismus nach Anspruch 12, ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzen bestehend aus Kartoffel, Rübe, Zuckerrübe, Tomate, Banane, Karotte, Zuckerrohr, Erdbeere, Ananas, Papaya, Soja, Hafer, Gerste, Weizen, Roggen, Triticale, Hirse und Mais.
- 35 14. Transgene Ernteprodukte, Vermehrungsmaterial, Zellen, Organe, Teile, Kalli, Zellkulturen, Samen, Knollen, Stecklinge oder transgene Nachkommen eines transgenen Organismus gemäß einem der Ansprüche 12 bis 13.
- 40 15. Verwendung eines transgenen Organismus nach einem der Ansprüche 12 bis 13 oder von diesem angeleitete transgene Ernteprodukte, Vermehrungsmaterial, Zellen, Organe, Teile, Kalli, Zellkulturen, Samen, Knollen, Stecklinge oder transgene Nachkommen nach Anspruch 14 zur Herstellung von Palatinose.

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM
GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

PCT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)



21 SEP 2004

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 0000053687	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übersendung des Internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/PEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03/07027	Internationales Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr) 02.07.2003	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 04.07.2002	
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N9/90			
Anmelder SUNGENE GMBH & CO. KGAA, et al.			

1. Dieser Internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.

2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 4 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 2 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I Grundlage des Bescheids
- II Priorität
- III Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V Begründete Feststellung nach Regel 66.2 a)ii) hinsichtlich der Neuheit, der erforderlichen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 18.12.2003	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 20.09.2004
Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Kania, T Tel. +49 89 2399-7703



I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):

Beschreibung, Seiten

1-61 in der ursprünglich eingereichten Fassung

Sequenzen, Seiten

1-50 in der ursprünglich eingereichten Fassung

Ansprüche, Nr.

1-15 eingegangen am 12.08.2004 mit Schreiben vom 09.08.2004

Zeichnungen, Blätter

1/8-8/8 in der ursprünglich eingereichten Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um:

- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- Beschreibung, Seiten:

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03/07027

Ansprüche, Nr.: _____

Zeichnungen, Blatt: _____

5. Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).
(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen.)

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 1-15
	Nein: Ansprüche
Erfinderische Tätigkeit (IS)	Ja: Ansprüche 1-15
	Nein: Ansprüche
Gewerbliche Anwendbarkeit (IA)	Ja: Ansprüche: 1-15
	Nein: Ansprüche:

2. Unterlagen und Erklärungen:

siehe Beiblatt

Dieser Bericht bezieht sich auf die im Internationalen Recherchenbericht aufgeführten Dokumente. Die Nummerierung (D1-D6) entspricht ihrer Reihenfolge im Recherchenbericht.

Gegenstand der Erfindung

Die Erfindung beschreibt die Expression von Saccharoseisomerase in transgenen Pflanzen unter Kontrolle von epidermis-spezifischen bzw. pathogen-induzierbaren Promotoren. Die Pflanzen zeigen daraufhin eine verringerte Anfälligkeit gegenüber Pathogenen, insbesondere Pilzen und Nematoden.

Neuheit und erfinderische Tätigkeit (Artikel 33 PCT)

Ein Zusammenhang zwischen der rekombinanten Expression von Saccharoseisomerase, der Bildung nicht-kariogener Zucker, wie z.B. Palatinose, in transgenen Pflanzen und einer Erhöhung der Resistenz gegenüber Schädlingen ist im Stand der Technik bislang unbekannt.

Aufgrund dessen können Neuheit und erfinderische Tätigkeit für die Verfahren der Ansprüche 1-7, sowie die Expressionskassetten und transgenen Organismen der Ansprüche 8-15 anerkannt werden.

Geänderte Patentansprüche

1. Verfahren zum Erzielen oder Erhöhen der Resistenz gegen mindestens ein Pathogen in pflanzlichen Organismen, wobei nachfolgende Arbeitsschritte umfasst sind
 - 5 a) transgene Expression eines Proteins mit Saccharoseisomerase Aktivität in einem pflanzlichen Organismus oder einem Gewebe, Organ, Teil oder Zelle desselben, und
 - b) Auswahl der pflanzlichen Organismen, bei denen - im Unterschied oder Vergleich zum Ausgangsorganismus - die Resistenz gegen mindestens ein Pathogen besteht oder erhöht ist.
- 10 2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Saccharose-Isomerase beschrieben wird durch
 - i) ein Protein gemäß SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 oder 36, oder
 - 15 ii) ein funktionelles Äquivalent zu einem Protein gemäß SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 oder 36, oder
 - iii) ein funktionell äquivalentes Fragment zu einem Protein gemäß i) und ii).
- 20 3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei die Expression der Saccharoseisomerase gewährleistet wird durch eine transgene Expressionskassette umfassend mindestens eine Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
 - a) Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 oder 36, und
 - 25 b) Nukleinsäuresequenzen kodierend für Proteine mit einer Homologie von mindestens 40% zu der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 oder 26 aufweisen, und
 - c) Nukleinsäuresequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 30 21 oder 35, und
 - d) Nukleinsäuresequenzen, die zu einer Nukleinsäuresequenz von c) degeneriert ist, und
 - e) Nukleinsäuresequenzen, die eine Homologie von mindestens 40% zu einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 35 oder 35 aufweisen, und
 - f) Nukleinsäuresequenzen, die mit einem komplementären Strang der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 oder 35 hybridisieren.
- 40 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Saccharose-Isomerase unter Kontrolle eines in Pflanzen funktionellen pathogen-induzierbaren oder gewebespezifischen Promotors exprimiert wird.

0817/427/2002 Ko

09.08.2004

Geänderte Ansprüche Vers. 2

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Pathogen ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Pilzen und Nematoden.
- 5 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Pathogen ausgewählt ist aus der Gruppe der Pilze bestehend aus Plasmodiophoromycota, Oomycota, Ascomycota, Chytridiomyceten, Zygomyceten, Basidiomycota und Deuteromyceten.
- 10 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Pflanze ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Kartoffel, Rübe, Zuckerrübe, Tomate, Banane, Karotte, Zuckerrohr, Erdbeere, Ananas, Papaya, Soja, Hafer, Gerste, Weizen, Roggen, Triticale, Hirse und Mais.
- 15 8. Transgene Expressionskassette enthalten in funktioneller Verknüpfung mit einem in Pflanzen funktionellen pathogen-induzierbaren Promotor eine Nukleinsäuresequenz kodieren für eine Saccharose-Isomerase.
9. Transgene Expressionskassette nach Anspruch 8, wobei die Saccharoseisomerase wie in einem der Ansprüche 2 oder 3 definiert ist.
- 20 10. Transgene Expressionskassette nach Anspruch 8 oder 9, wobei der pathogen-induzierbare Promotor ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 23, 24, 32, 33 oder 34.
- 25 11. Transgener Expressionsvektor enthaltend eine transgene Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10.
12. Transgener Organismus enthaltend eine transgene Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10 oder einen transgenen Expressionsvektor gemäß Anspruch 11.
- 30 13. Transgener Organismus nach Anspruch 12, ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzen bestehend aus Kartoffel, Rübe, Zuckerrübe, Tomate, Banane, Karotte, Zuckerrohr, Erdbeere, Ananas, Papaya, Soja, Hafer, Gerste, Weizen, Roggen, Triticale, Hirse und Mais.
- 35 14. Transgene Ernteprodukte, Vermehrungsmaterial, Zellen, Organe, Teile, Kalli, Zellkulturen, Samen, Knollen, Stecklinge oder transgene Nachkommen eines transgenen Organismus gemäß einem der Ansprüche 12 bis 13.
- 40 15. Verwendung eines transgenen Organismus nach einem der Ansprüche 12 bis 13 oder von diesem angeleitete transgene Ernteprodukte, Vermehrungsmaterial, Zellen, Organe, Teile, Kalli, Zellkulturen, Samen, Knollen, Stecklinge oder transgene Nachkommen nach Anspruch 14 zur Herstellung von Palatinose.

REPLACED BY

59

ART 34 AMDT

We claim:

1. A method for generating or increasing the resistance to at
5 least one pathogen in plant organisms, which comprises the
following process steps
 - a) transgenic expression of a protein with sucrose isomerase
activity in a plant organism and
10
 - b) selection of those plant organisms in which, as opposed
or as compared to the original plant, the resistance to
at least one pathogen exists or is increased.
- 15 2. The method according to claim 1, wherein the sucrose isomerase
is described by
 - i) a protein as shown in SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16,
18 or 36, or
20
 - ii) a functional equivalent to a protein as shown in SEQ ID
NO: 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 or 36, or
 - 25 iii) a functionally equivalent fragment to a protein as shown
in i) and ii).
3. The method according to claim 1 or 2, wherein the expression
of the sucrose isomerase is ensured by a transgenic expres-
30 sion cassette comprising at least one nucleic acid sequence
selected from the group consisting of:
 - a) nucleic acid sequences encoding an amino acid sequence as
shown in SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20,
22 or 36, and
35
 - b) nucleic acid sequences encoding proteins with at least
40% homology with the sequence as shown in SEQ ID NO: 2,
4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 or 36, and
 - 40 c) nucleic acid sequences as shown in SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7,
9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 or 35, and
 - d) nucleic acid sequences which are degenerated to a nucleic
acid sequence of c), and
45

REPLACED BY

ART 34 AMDT 60

- e) nucleic acid sequences with at least 40% homology with a nucleic acid sequence as shown in SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 or 35, and
- 5 f) nucleic acid sequences which hybridize with a complementary strand of the nucleic acid sequence as shown in SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 or 35.
- 10 4. The method according to any of claims 1 to 3, wherein the sucrose isomerase is expressed under the control of a pathogen-inducible promoter which is functional in plants.
- 15 5. The method according to any of claims 1 to 4, wherein the pathogen is selected from the group consisting of fungi and nematodes.
- 20 6. The method according to any of claims 1 to 5, wherein the pathogen is selected from the group of the fungi consisting of Plasmidiophoramycota, Oomycota, Ascomycota, Chytridiomycetes, Zygomycetes, Basidiomycota and Deuteromycetes.
- 25 7. The method according to any of claims 1 to 6, wherein the plant is selected from the group consisting of potato, beet, sugar beet, tomato, banana, carrot, sugar cane, strawberry, pineapple, paw paw, soybean, oats, barley, wheat, rye, triticale, sorghum and millet, and maize.
- 30 8. A transgenic expression cassette comprising a nucleic acid sequence encoding a sucrose isomerase, in operable linkage with a pathogen-inducible promoter which is functional in plants.
- 35 9. The transgenic expression cassette according to claim 8, wherein the sucrose isomerase is defined as claimed in one of claims 2 or 3.
- 40 10. The transgenic expression cassette according to claim 8 or 9, wherein the pathogen-inducible promoter is selected from the group consisting of one of the sequences as shown in SEQ ID NO: 23, 24, 32, 33 or 34.
- 11. A transgenic expression vector comprising the transgenic expression cassette according to any of claims 8 to 10..

REPLACED BY
PART 34 AND DT

61

12. A transgenic organism comprising the transgenic expression cassette according to any of claims 8 to 10 or a transgenic expression vector as claimed in claim 11.
- 5 13. The transgenic organism according to claim 12, selected from the group of the plants consisting of potato, beet, sugar beet, tomato, banana, carrot, sugar cane, strawberry, pineapple, paw paw, soybean, oats, barley, wheat, rye, triticale, sorghum and millet, and maize.
- 10 14. A transgenic crop product, propagation material, cells, organs, parts, calli, cell cultures, seeds, tubers, sets or transgenic progeny of the transgenic organism according to one of claims 12 or 13.
- 15 15. The use of the transgenic organism according to one of claims 12 or 13, or transgenic crop products, propagation material, cells, organs, parts, calli, cell cultures, seeds, tubers, derived therefrom or transgenic progeny according to 20 claim 14 for the production of palatinose.

25

30

35

40

45

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. Januar 2004 (15.01.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/005504 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 9/90, (74) Anwalt: PRESSLER, Uwe; c/o BASF Aktiengesellschaft, 67056 Ludwigshafen (DE).

15/82

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/007027

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:
2. Juli 2003 (02.07.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 30 220.0 4. Juli 2002 (04.07.2002) DE

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



WO 2004/005504 A1

(54) Title: METHODS FOR OBTAINING PATHOGEN RESISTANCE IN PLANTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM ERREICHEN EINER PATHOGENRESISTENZ IN PFLANZEN

(57) Abstract: The invention relates to methods for creating or increasing pathogen resistance in plants by preferably pathogen-inducible expression of a sucrose isomerase.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung einer Pathogenresistenz in Pflanzen durch - bevorzugt pathogeninduzierbare - Expression einer Saccharoseisomerase.

Verfahren zum Erreichen einer Pathogenresistenz in Pflanzen

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung einer Pathogenresistenz in Pflanzen durch – bevorzugt pathogeninduzierbare – Expression einer Saccharoseisomerase.

10 Palatinose (Isomaltulose) und Trehalulose werden großtechnisch aus Saccharose durch eine enzymatische Umlagerung unter Verwendung von immobilisierten Bakterienzellen hergestellt. Dabei wird die zwischen den Monosacchariden des Disaccharids Saccharose bestehende ($\alpha 1 \rightarrow \beta 2$ -glykosidische Bindung zu einer $\alpha 1 \rightarrow \alpha 6$ -Bindung 15 bei Palatinose bzw. einer $\alpha 1 \rightarrow \alpha 1$ -Bindung bei Trehalulose isomertisiert. Diese Umlagerung von Saccharose zu den beiden nicht-kariogenen Disacchariden erfolgt unter Katalyse des bakteriellen Enzyms Saccharoseisomerase, auch Saccharosemutase genannt. Entsprechende Sequenzen sind beispielsweise in WO 95/20047 20 (US 5,786,140; US 5,985,622) beschrieben.

Ferner sind beschrieben Saccharoseisomerasen aus *Erwinia rhabontici* (palI Gen, GenBank Acc.-No.: AF279281; Börnke et al. (2001) J Bacteriol 183(8):2425-2430) und *Klebsiella* sp. Strain 25 LX3 (GenBank Acc.-No.: AY040843; Zhang et al. (2002) Appl Environ Microbiol (68):2676-2682).

WO 01/59136 beschreibt Verfahren zur direkten Herstellung nicht-kariogener Zucker direkt in transgenen Pflanzen, die rekombinante 30 Nukleinsäuremoleküle kodierend für Proteine mit der enzymatischen Aktivität einer Saccharoseisomerase enthalten. Beschrieben sind Expressionskonstrukte für besagte Saccharoseisomerase zur Expression in Pflanzen, sowie die mit denselben transformierten transgenen Pflanzen.

35

WO 01/59135 beschreibt Verfahren zur Beeinflussung der Pollenentwicklung unter Verwendung von antheren-, tapetum oder pollenspezifisch exprimierten Saccharoseisomerasen. Die konstitutive Expression der Saccharoseisomerase in Pflanzen hat jedoch nach- 40 teilige Wirkung auf das Wachstum der Pflanze (Börnke F et al. (2002) Planta 214:356-364).

Ziel biotechnologischer Arbeiten an Pflanzen ist die Herstellung von Pflanzen mit vorteilhaften, neuen Eigenschaften zum Beispiel 45 zur Steigerung der landwirtschaftlichen Produktivität, zur Qualitätssteigerung bei Nahrungsmitteln oder zur Produktion bestimmter Chemikalien oder Pharmazeutika. Oft sind die natürlichen Abwehr-

mechanismen der Pflanze gegen Pathogene unzureichend. Allein Pilzerkrankungen führen zu Ernteverlusten in der Höhe von vielen Milliarden US-\$ jährlich. Die Einführung fremder Gene aus Pflanzen, Tieren oder mikrobiellen Quellen kann die Abwehr verstärken.

5 Beispiele sind der Schutz gegen Insektenfrass in Tabak durch Expression von *Bacillus thuringiensis* Endotoxinen unter Kontrolle des 35 S CaMV Promoters (Vaeck et al. (1987) *Nature* 328:33-37) oder der Schutz des Tabaks gegen Pilzbefall durch Expression einer Chitinase aus der Bohne unter Kontrolle des CaMV Promoters 10 (Broglie et al. (1991) *Science* 254:1194-1197). Die meisten der beschriebenen Ansätze gewähren jedoch nur eine Resistenz gegen ein einzelnes Pathogen oder gegen ein schmales Spektrum von Pathogenen.

15 Es gibt nur wenige Ansätze, die Pflanzen eine Resistenz gegen ein breiteres Spektrum von Pathogenen, vor allem Pilzpathogene, verleihen. Die systemische erworbene Resistenz ("systemic acquired resistance"; SAR) - ein Abwehrmechanismus bei verschiedenen Pflanze/Pathogen-Interaktionen - kann durch Applikation von endo-

20 genen Botenstoffen wie Jasmonsäure (JA) oder Salicylsäure (SA) vermittelt werden (Ward, et al. (1991) *Plant Cell* 3:1085-1094; Uknes, et al. (1992) *Plant Cell* 4(6):645-656). Ähnliche Effekte können auch durch synthetische Verbindungen wie 2,6-Dichlorisonikotinsäure (INA) oder Benzo(1,2,3)thiadiazol-7-thiocarbonsäure- 25 S-methylester (BTH; Bion®) (Friedrich et al. (1996) *Plant J* 10(1):61-70; Lawton et al. (1996) *Plant J.* 10:71-82) bewirkt werden. Auch die Expression der im Rahmen eines SAR hoch-regulierten "pathogenesis related" (PR) Proteine vermag zum Teil eine Pathogenresistenz zu bewirken.

30 In Gerste ist bereits seit längerem der Mlo-Locus als negativer Regulator der Pathogenabwehr beschrieben. Der Verlust oder Funktionsverlust ("loss-of-function") des Mlo-Gens bedingt eine erhöhte und vor allem rassen-unspezifische Resistenz beispiels-

35 weise gegen zahlreiche Arten von Mehltau (Büsches R et al. (1997) *Cell* 88:695-705; Jorgensen JH (1977) *Euphytica* 26:55-62; Lyngkjaer MF et al. (1995) *Plant Pathol* 44:786-790). Das Mlo-Gen wurde erst kürzlich kloniert (Büsches R et al. (1997) *Cell* :695-705; WO 98/04586; Schulze-Lefert P, Vogel J (2000)

40 *Trends Plant Sci.* 5:343-348). Verschiedene Verfahren unter Verwendung von Mlo-Genen zum Erzielen einer Pathogenresistenz sind beschrieben (WO 98/04586; WO 00/01722; WO 99/47552). Unklar ist, ob ein Mlo-basierter Ansatz auch in dikotyledonen Pflanzen praktikabel ist.

Generell leben pflanzenpathogene Pilzarten saprophytisch oder parasitisch. Letztere sind - zumindest in bestimmten Phasen ihres Lebenszyklus - auf ein Wirkstoffangebot (z.B. ein Angebot an Vitaminen, Kohlenhydraten usw.) angewiesen, wie es in dieser Form 5 nur von lebenden Pflanzenzellen bereitgestellt werden kann. Der Fachmann unterscheidet parasitäre Pilze in nekrotrophe, hemibiotrophe und biotrophe. Bei nekrotrophen pilzlichen Parasiten führt die Infektion zur Gewebezerstörung und damit zum Tod der Pflanze. Diese Pilze sind meist nur fakultativ parasitär; sie können sich 10 ebenso gut saprophytisch in totem oder absterbendem Pflanzenmaterial vermehren.

Biotrophe pilzliche Parasiten sind dadurch charakterisiert, dass Parasit und Wirt, zumindest über längere Zeiträume hinweg, 15 zusammenleben. Der Pilz entnimmt dem Wirt Nährstoffe, tötet ihn jedoch nicht ab. Die meisten biotrophen Pilze sind obligate Parasiten. Hemibiotrophe Pilze leben zeitweise biotroph und töten den Wirt zu einem späteren Zeitpunkt ab, d.h. sie wechseln in eine nekrotrophe Phase.

20 Einer weitere große Gruppe biotropher pflanzlicher Pathogene von enormer agro-ökonomischer Bedeutung stellen Nematoden dar. Pflanzenpathogene Nematoden entnehmen ihre Nahrung aus den äußeren pflanzlichen Gewebeabschnitten (Ektoparasiten) oder nach 25 dem Eindringen in die Pflanze aus tiefer liegenden Zellschichten (Endoparasiten). Bei den endoparasitären Wurzelnematoden unterscheidet man nach ihrer Lebens- und Ernährungsweisen zwischen zwei Gruppen: Zystenbildende Nematoden (Heterodera- und Globodera-Arten) und Wurzelgallennematoden (Meloidogyne-Arten). Bei 30 beiden Gruppen handelt es sich um obligate biotrophe Parasiten, die in den Wurzeln die Bildung spezieller Nährzellen induzieren. Bei diesen Nährzellen handelt es sich um Pflanzenzellen, deren Stoffwechsel von den Nematoden so verändert wurde, dass sie gezielt der Ernährung der sich entwickelten Nematoden dienen. Endoparasitäre Wurzelnematoden sind in ihrer Entwicklung von diesen Nährzellen absolut abhängig (zur Übersicht siehe Sijmons et al. 35 (1994) Ann. Rev. Phytopathol. 32: 235-259). Zystenbildende Nematoden (Heterodera- und Globodera-Arten) verbleiben an der Parasitierungsstelle in der Wurzel (sessile Endoparasiten) 40 wandeln die sie umgebenden Zellen durch Protoplastenfusion bei teilweiser Zellwandauflösung in Syncytien um. Diesen Nährzellen, die im Zentralzylinder der Wurzel gebildet werden, entnehmen die Nematoden ihre Nahrung und schwollen dabei stark an. Wurzelgallennematoden (Meloidogyne-Arten) verbleiben ebenfalls an der 45 einmal gewählten Parasitierungsstelle und veranlassen die Bildung von Nährzellen, welche aber, anders als bei den Zystenbildenden Nematoden aus mehreren, durch synchrone Kernteilungen ohne Zell-

wandbildung sich entwickelnden vielkernigen Riesenzellen bestehen (Fenoll and Del Campo (1998) *Physiol. Mol. Biol. Plants* 4:9-18). Die Bildung der Nährzellensysteme wird durch die Signalmoleküle im Speichel der Nematoden induziert. Es ist bekannt, dass während 5 dieser Differenzierungsprozesse eine Reihe von Pflanzengenen ihr Expressionsprofil stark verändern. In der Literatur sind Promotoren beschrieben, die speziell in Nährzellsystem (Syncytien) induziert werden. Beispielhaft seien zu nennen der Δ 0.3 TobRB7 Promotor aus Tabak (Opperman et al. (1994) *Science* 263:221-223, 10 der Lemmi9 Promotor aus Tomate (Ecobar et al. (1999) *Mol Plant Microbe Interact* 12: 440-449), sowie Geminivirus V-sense Promotoren (WO 00/01832).

WO 94/10320 beschreibt DNA Konstrukte zur Expression von Genen, 15 die als Inhibitoren endogener Pflanzengene wirken (z.B. ATP Synthase, Cytochrom C, Pyruvatkinase), unter der Kontrolle von Nematoden-induzierter Promotoren in den Syncytien.

Trotz einiger Fortschritte in manchen Bereichen der Pflanzen- 20 biotechnologie, sind die Erfolge beim Erzielen einer Pathogenresistenz in Pflanzen sehr begrenzt und bislang nur gegen Viren hinreichend belegt. Insbesondere Ernteverluste infolge von Pilz- und Nematodenbefall stellen ein ernstzunehmendes Problem dar und erfordern nach wie vor den intensiven Einsatz von Fungiziden und 25 Nematoziden. Dennoch sind die damit zusammenhängenden Probleme nur unzureichend in den Griff zu bekommen.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, neue Ver- 30 fahren zur Pathogenabwehr in Pflanzen bereitzustellen, die eine effiziente Abwehr eines möglichst breiten Spektrums von Pathogenen, bevorzugt von Pilzen und Nematoden, in möglichst vielen verschiedenen Pflanzenarten, bevorzugt den in der Landwirtschaft verwendeten Kulturpflanzen bewirken. Diese Aufgabe wird durch das erfindungsgemäße Verfahren gelöst.

35 Ein erster Gegenstand der Erfindung umfasst ein Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung der Resistenz gegen mindestens ein Pathogen in pflanzlichen Organismen, wobei nachfolgende Arbeitsschritte umfasst sind

40 a) transgene Expression eines Proteins mit Saccharoseisomerase Aktivität in einem pflanzlichen Organismus oder einem Gewebe, Organ, Teil oder Zelle desselben, und

b) Auswahl der pflanzlichen Organismen, bei denen – im Unterschied oder Vergleich zur Ausgangsorganismus – die Resistenz gegen mindestens ein Pathogen besteht oder erhöht ist.

5 Das erfindungsgemäße Verfahren kann im Prinzip auf alle pflanzlichen Organismen angewendet werden, die Saccharose produzieren. Dazu zählen alle höheren Pflanzen. Es wurde überraschender Weise beobachtet, dass auf Kartoffelscheiben transgener Kartoffelpflanzen, in deren Knollen aufgrund transgener Expression einer

10 Saccharoseisomerase Saccharose in Palatinose umgewandelt wird, das Wachstum des Pilzes *Alternaria* signifikant gehemmt ist.

Ferner kann beobachtet werden, dass die transgene Expression der Saccharoseisomerase auch eine Resistenz gegen Nematoden bewirkt.

15 Insbesondere eine durch endoparasitären Wurzelnematoden hervorgerufene Syncitien-spezifische Expression der Saccharoseisomerase-sequenz bewirkt eine deutliche Reduktion des Nematodenbefalls.

Da zahlreiche Pathogene, insbesondere Pilze und Nematoden, Palatinose nicht verstoffwechseln können, ist eine Überwindung der Resistenz durch einfache Mutation in den Pathogenen kaum möglich, da hierfür die Gewinnung einer neuen Enzymaktivität erforderlich wäre.

25 "Protein mit Saccharoseisomerase Aktivität" meint im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Protein, das als "wesentliche Eigenschaft" die Isomerisierung von Saccharose zu anderen Disacchariden katalysiert, wobei die $\alpha 1 \rightarrow \beta 2$ -glykosidische Bindung zwischen Glukose und Fruktose in der Saccharose in eine andere 30 glykosidische Bindung zwischen zwei Monosaccharideinheiten überführt wird, insbesondere in eine $\alpha 1 \rightarrow \alpha 6$ -Bindung und/oder einer $\alpha 1 \rightarrow \alpha 1$ -Bindung.

40 Eine Saccharoseisomerase-Aktivität kann indirekt über die Analyse der resultierenden Kohlenhydrate (z.B. Palatinosegehalt) in der dem Fachmann geläufigen Weise beispielsweise durch Analyse ethanolisches Extrakte entsprechenden biologischen Materials (z.B. Material einer transgenen Pflanze oder eines Mikroorganismus) gemessen werden. Besagte Extrakte können z.B. 45 durch HPLC analysiert und die Zucker anhand der entsprechenden Standards identifiziert werden. Ein Verfahren zur Analyse ist z.B. in WO 01/59136 beschrieben. So werden zum Nachweis von Saccharoseisomerase-Aktivität in Pflanzenextrakten Blattscheiben mit einem Durchmesser von ca. 0,8 cm für 2 h bei 70°C mit 100 μ l 50 80 % Ethanol und 10 mM HEPES-Puffer (pH 7,5) extrahiert. Für die Analyse eines Aliquots dieser Extrakte kann ein HPLC-System z.B. der Firma Dionex verwendet werden, welches mit einer PA-1 (4 x

250 mm) -Säule und einen gepulsten elektrochemischen Detektor ausgestattet werden kann. Vor der Injektion können die Proben für 2 Minuten bei 13.000 rpm abzentrifugiert werden. Die Zucker können anschließend mit einem 10 minütigen Gradienten von 0 bis 1 5 M Natriumacetat nach 4 Minuten bei 150 mM NaOH und einer Durchflussrate von 1 ml/min eluiert werden. Zur Identifizierung und Quantifizierung der Zucker können die entsprechenden Standards der Firma Sigma verwendet werden.

10 Besonders bevorzugt wird unter einem Protein mit Saccharose-isomerase Aktivität ein Protein verstanden, das als wesentliche Eigenschaft zur Isomerisierung von Saccharose zu Palatinose und/oder Trehalulose befähigt ist. Dabei beträgt der Anteil von Palatinose und Trehalulose an den gesamten Disacchariden, die 15 durch Isomerisierung von Saccharose gebildet werden mindestens 2 %, bevorzugt mindestens 20 %, besonders bevorzugt mindestens 50 % und am meisten bevorzugt mindestens 60 %.

Die Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Protein mit Saccharose-isomerase-Aktivität, kann aus natürlichen Quellen isoliert oder 20 nach herkömmlichen Verfahren synthetisiert werden.

Beispiele für Organismen, deren Zellen Proteine mit Saccharose-isomerase-Aktivität sowie die dafür kodierende Nukleinsäure- 25 sequenzen enthalten, sind insbesondere Mikroorganismen der Gattungen *Protaminobacter*, *Erwinia*, *Serratia*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Klebsiella* und *Enterobacter*. Insbesondere sind hier folgende Beispiele für solche Mikroorganismen zu nennen:

30 *Protaminobacter rubrum* (CBS 547, 77), *Erwinia rhabontici* (NCPPB 1578), *Serratia plymuthica* (ATCC 15928), *Serratia marcescens* (NCIB 8285), *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-52 If (ATCC 1083 0a). *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45 (FERM 11808 bzw. FERM BP 3619), *Agrobacterium radiobacter* MX-232 (FERM 12397 bzw. FERM BP 35 3620), *Klebsiella* subspezies und *Enterobacter* spezies.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Nukleinsäure- 40 sequenz kodierend für ein Protein mit einer Saccharose-isomerase-Aktivität, Nukleinsäuresequenzen, die für Proteine mit Saccharoseisomerase-Aktivität kodieren, wobei die Nukleinsäuren ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus

- i) Nukleinsäuresequenzen kodierend ein Protein gemäß SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 oder 36 und

- ii) Nukleinsäuresequenzen kodierend ein funktionelles Äquivalent zu einem Protein gemäß SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 oder 36 und
- 5 iii) Nukleinsäuresequenzen kodierend für funktionell äquivalente Fragmente zu einem Protein gemäß i) und ii).

Weitere Nukleinsäuresequenzen, die für Proteine mit Saccharose-isomerase-Aktivität kodieren, sind im Stand der Technik bekannt 10 und stehen dem Fachmann somit für den Transfer auf Pflanzenzellen zur Verfügung. So sind z.B. Sequenzen aus *Protaminobacter rubrum*, *Erwinia rhipontici*, *Enterobacter species SZ 62* und *Pseudomonas mesoacidophila MX-45* in WO 95/20047 beschrieben. Auf die 15 Offenbarung dieser Patentanmeldung wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen, sowohl hinsichtlich der offenbarten Sequenzen selbst, als auch im Hinblick auf die Auffindung und Charakterisierung dieser und weiterer Saccharoseisomerase kodierender Sequenzen aus anderen Quellen.

20 Weitere für Saccharoseisomerasen kodierende DNA-Sequenzen kann der Fachmann u.a. den Gendatenbanken unter Verwendung geeigneter Suchprofile und Computerprogramme für das Durchmustern nach homologen Sequenzen bzw. für Sequenzvergleiche entnehmen. Darüber hinaus kann der Fachmann weitere Saccharoseisomerase kodierende 25 Nukleinsäuresequenzen aus anderen Organismen mittels herkömmlicher molekularbiologischer Techniken selbst auffinden und im Rahmen der vorliegenden Erfindung einsetzen. So kann der Fachmann z.B. geeignete Hybridisierungssonden von den bekannten Saccharoseisomerase-Sequenzen ableiten und für das Durchmustern 30 von cDNA- und/oder genomischen Banken des jeweils gewünschten Organismus, aus dem ein neues Saccharoseisomerase-Gen isoliert werden soll, einsetzen. Hierbei kann der Fachmann auf geläufige Hybridisierungs-, Klonierungs- und Sequenzierungsmethoden zurückgreifen (siehe z.B. Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: 35 A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York). Ebenso ist der Fachmann in der Lage, anhand bekannter Saccharoseisomerase-DNA-Sequenzen geeignete - gegebenenfalls degenerierte - Oligonukleotide als Primer für Klonierungen neuer Gene mittels PCR zu synthetisieren 40 und erfolgreich einzusetzen.

Proteine mit Saccharoseisomerase Aktivität sowie die dafür kodierenden Nukleinsäuresequenzen kann der Fachmann in der ihm geläufigen Weise unschwer aus solchen Organismen isolieren, in 45 denen solche Aktivitäten detektiert wurden. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (z.B. DE 44 14 185). So kann z.B. durch partiellen Verdau von genomischer DNA eines solchen Organismus

(bevorzugt eines Mikroorganismus) und Einbringen der erhaltenen Fragmente in geeignete E.coli-Vektoren und Transformation einer Genbank gewonnen werden, deren Klone genomische Abschnitte zwischen 2 und 15 kb des Spenderorganismus enthalten. Aus E.coli-Zellen, die diese Plasmide tragen, werden durch Plattierung auf McConkey-Palatinosemedium solche ausgewählt, die eine Rotfärbung der Kolonie aufweisen. Die in diesen Zellen enthaltene Plasmid-DNA wird in eine E.coli-Mutante überführt, die auf Galactose als einziger C-Quelle nicht wachsen kann (z.B. ED 8654, Sambrook et al., supra, Seiten A9-A13). Diese transformierte Zelllinie ist zur Identifikation von Palatinoseproduzenten in der wie oben beschrieben hergestellten Genbank aus DNA des Spenderorganismus in der Lage. Zur Identifikation der gesuchten Palatinose-bildenden Klone werden die Zellen der Genbank auf Minimal-Salzmedien mit Galactose und Saccharose vereinzelt und angezogen. Nach Replika-Stempeln der Kolonien auf Platten mit dem gleichen Medium werden die Zellen durch Bedämpfung mit Toluol abgetötet. Anschließend werden Zellen des Screeningstamms als Rasen in Minimalsalz-Weichagar ohne C-Quellenzusatz über die Kolonien der Genbank ausgebracht und bebrütet. Es entsteht signifikantes Wachstum der Zellen des Screeningstamms nur am Ort von Zellen der Genbank, die Palatinose produziert haben. Bei Prüfung der Zellen der Replikakontrolle ergibt sich der Gehalt an Isomerase. Diese so identifizierten E.coli-Klone sind auf Palatinose als einziger C-Quelle im Medium nicht wachstumsfähig, zeigen im Test der ganzen Zellen oder in Zellextrakten keine Fähigkeit zur Spaltung von Saccharose, bilden aber unter diesen Bedingungen und ohne Zusatz von Saccharose zum Medium bei der Anzucht Palatinose.

Alternativ können Isomerase-Klone auch unter Verwendung eines PCR-Fragments identifiziert werden. Verwendet man Plasmid-DNA den so identifizierten E.coli-Klonen als Sonden zur Hybridisierung an Filtern mit immobilisierter DNA aus dem Spenderorganismus, lassen sich die Genbereiche, die Isomerase-gene tragen, nachweisen und gezielt verfügbar machen.

Funktionelle Äquivalente der im Rahmen dieser Erfindung offenbarten Proteine mit Saccharoseisomerase-Aktivität umfassen bevorzugt solche aus anderen Organismen, beispielsweise aus Mikroorganismen, deren genomische Sequenz ganz oder teilweise bekannt ist, wie beispielsweise aus Mikroorganismen der Gattungen Protaminobacter, Erwinia, Serratia, Leuconostoc, Pseudomonas, Agrobacterium, Klebsiella und Enterobacter. Diese können z.B. durch Datenbanksuche in Sequenzdatenbanken wie GenBank oder Durchmustern von Gen- oder cDNA-Banken - z.B. unter Verwendung der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 oder eines Teils derselben als

Suchsequenz bzw. Sonde - aufgefunden werden. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Aminosäurerreste.

5 So kann der Fachmann, falls erwünscht, zusätzlich mittels Routinetchniken, verschiedenartige Mutationen in die die Saccharoseisomerase kodierende DNA-Sequenz einführen, wodurch es zur Synthese von Proteinen mit eventuell veränderten biologischen Eigenschaften kommt. So ist es z.B. möglich, gezielt

10 Enzyme herzustellen, die durch Addition entsprechender Signalsequenzen in bestimmten Kompartimenten der Pflanzenzelle lokalisiert sind. Derartige Sequenzen sind in der Literatur beschrieben und dem Fachmann bekannt (siehe z.B. Braun et al. (1992) EMBO J 11:3219-3227; Wolter F et al. (1988) Proc Natl Acad 15 Sci USA 85:846-850; Sonnewald U et al. (1991) Plant J 1:95-106).

Weiterhin ist auch die Einführung von Punktmutationen an Positionen denkbar, bei denen eine Veränderung der Aminosäuresequenz einen Einfluss beispielsweise auf die Enzymaktivität 20 oder die Regulierung des Enzyms hat. Auf diese Weise können z.B. Mutanten hergestellt werden, die nicht mehr den normalerweise in der Zelle herrschenden Regulationsmechanismen über allosterische Regulation oder kovalente Modifizierung unterliegen. Des weiteren können Mutanten hergestellt werden, die eine veränderte Substrat- 25 oder Produktspezifität aufweisen. Weiterhin können Mutanten hergestellt werden, die ein verändertes Aktivitäts-, Temperatur- und/oder pH-Profil aufweisen.

Die Degeneration des genetischen Codes bietet dem Fachmann u.a. 30 die Möglichkeit, die Nukleotidsequenz der DNA-Sequenz an die Codonpräferenz ("codon usage") der Zielpflanze, also der aufgrund der Expression der Saccharoseisomerase-Nukleinsäuresequenz pathogenresistenten Pflanze bzw. Pflanzenzelle, anzupassen und die Expression dadurch zu optimieren.

35 Für die gentechnische Manipulation in prokaryontischen Zellen können die erfindungsgemäßen rekombinanten Nukleinsäuremoleküle oder Teile davon in Plasmide eingebracht werden, die eine Mutationen oder eine Sequenzveränderung durch Rekombination von DNA- 40 Sequenzen erlauben. Mit Hilfe von Standardverfahren (siehe z.B. Sambrook et al. (1989), vide supra) können Basenaustausche vorgenommen oder natürliche oder synthetische Sequenzen hinzugefügt werden. Für die Verbindung der DNA-Fragmente untereinander können an die Fragmente - wo erforderlich - Adapter oder Linker angefügt 45 werden. Ferner können mittels enzymatischer und anderer Manipulationen passende Restriktionsschnittstellen zur Verfügung gestellt oder überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen

10

entfernt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen in Frage kommen, können in vitro-Mutagenese, "primer repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Als Analysemethoden werden im allgemeinen Sequenzanalyse, Restriktionsanalyse und 5 weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden durchgeführt.

Bevorzugt haben besagte funktionelle Äquivalente eine Homologie von mindestens 40 %, besonders bevorzugt mindestens 50 %, besonders bevorzugt mindestens 70 %, am meisten bevorzugt
10 mindestens 90 % zu einer der Polypeptidsequenzen mit der SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 oder 36. Dabei erstreckt sich die Homologie über mindestens 30 Aminosäuren, bevorzugt mindestens 60 Aminosäuren besonders bevorzugt mindestens 90 Aminosäuren, am meisten bevorzugt über die gesamte Länge eines
15 der Polypeptide gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 oder 36.

Unter Homologie zwischen zwei Polypeptiden wird die Identität der Aminosäuresequenz über die jeweilige Sequenzlänge ver-
20 standen, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

25 Gap Weight: 8 Length Weight: 2

Average Mismatch:-2.003

Average Match: 2,912

Average Mismatch:-2.003

Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von 30 mindestens 80 % auf Proteinbasis mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 80 % aufweist.

35 Funktionelle Äquivalente umfasst auch solche Proteine, die durch Nukleinsäuresequenzen kodiert werden, die eine Homologie von mindestens 40 %, besonders bevorzugt mindestens 50 %, besonders bevorzugt mindestens 70 %, am meisten bevorzugt mindestens 90 % zu einer der Nukleinsäuresequenzen mit der SEQ ID NO: 1, 3, 40 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 oder 35 haben. Dabei erstreckt sich die Homologie über mindestens 100 Basen, bevorzugt mindestens 200 Basen besonders bevorzugt mindestens 300 Basen, am meisten bevorzugt über die gesamte Länge einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 oder 35.

11

Unter Homologie zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen wird die Identität der beiden Nukleinsäuresequenzen über die jeweilige Sequenzlänge verstanden, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0,

5 University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA; Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389ff) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

Gap Weight: 50

Length Weight: 3

10

Average Match: 10

Average Mismatch: 0

Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von mindestens 80 % auf Nukleinsäurebasis mit der Sequenz

15 SEQ ID NO: 1 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 80 % aufweist.

20 Funktionelle Äquivalente umfasst auch solche Proteine, die durch Nukleinsäuresequenzen kodiert werden, die unter Standardbedingungen mit einer der durch SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 oder 35 beschriebenen Nukleinsäuresequenz, der zu dieser komplementären Nukleinsäuresequenz oder Teilen der vor- 25 genannten hybridisieren und die wesentlichen Eigenschaften einer Saacharoseisomerase aufweisen.

"Standardhybridisierungsbedingungen" ist breit zu verstehen und meint stringente als auch weniger stringente Hybridisierungs- 30 bedingungen. Solche Hybridisierungsbedingungen sind unter anderem bei Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T et al., in Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57) oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 35 6.3.1-6.3.6.) beschrieben.

Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrifftes ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit geringer Stringenz (mit ungefähr 2X SSC bei 50°C) und 40 solchen mit hoher Stringenz (mit ungefähr 0,2X SSC bei 50°C bevorzugt bei 65°C) (20X SSC: 0,3 M Natriumcitrat, 3 M NaCl, pH 7,0). Darüber hinaus kann die Temperatur während des Waschschrifftes von niedrig stringenten Bedingungen bei Raumtemperatur, ungefähr 22°C, bis zu stärker stringenten Bedingungen bei ungefähr 65°C angehoben 45 werden. Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden.

12

Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50 % Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C ausgeführt. Einige beispielhafte Bedingungen für Hybridisierung 5 und Waschschrift sind infolge gegeben:

(1) Hybridisierungbedingungen zum Beispiel aus nachfolgenden Bedingungen ausgewählt sein:

10 a) 4X SSC bei 65°C,
b) 6X SSC bei 45°C,
c) 6X SSC, 100 µg/ml denaturierter, fragmentierte Fischsperma-DNA bei 68°C,
f) 50 % Formamid, 4X SSC bei 42°C,
15 h) 2X oder 4X SSC bei 50°C (schwach stringente Bedingung),
i) 30 bis 40 % Formamid, 2X oder 4X SSC bei 42°C (schwach stringente Bedingung).

(2) Waschschrifte können zum Beispiel aus nachfolgenden 20 Bedingungen ausgewählt sein:

a) 0,015 M NaCl/0,0015 M Natriumcitrat/0,1 % SDS bei 50°C.
b) 0,1X SSC bei 65°C.
c) 0,1X SSC, 0,5 % SDS bei 68°C.
25 d) 0,1X SSC, 0,5 % SDS, 50 % Formamid bei 42°C.
e) 0,2X SSC, 0,1 % SDS bei 42°C.
f) 2X SSC bei 65°C (schwach stringente Bedingung).

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Nukleinsäure-30 sesequenz kodierend für ein Protein mit einer Saccharoseisomerase-Aktivität, Nukleinsäuresequenzen, die für Proteine mit Saccharoseisomerase-Aktivität kodierend, wobei die Nukleinsäuren ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus

35 a) Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 oder 36, und
b) Nukleinsäuresequenzen kodierend für Proteine mit einer Homologie von mindestens 40 % zu der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 40 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 oder 36 aufweisen, und
c) Nukleinsäuresequenzen gemäß SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 oder 35, und

- d) Nukleinsäuresequenzen, die zu einer Nukleinsäuresequenz von
c) degeneriert ist, und
- e) Nukleinsäuresequenzen, die eine Homologie von mindestens 40 %
5 zu einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9,
11, 13, 15, 17, 19, 21 oder 35 aufweisen, und
- f) Nukleinsäuresequenzen, die mit einem komplementären Strang
der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11,
10 13, 15, 17, 19, 21 oder 35 hybridisieren,

sowie funktionell äquivalenten Fragmenten der vorgenannten.

Funktionell äquivalente Fragmente meint in Bezug auf ein Protein
15 mit Saccharoseisomerase-Aktivität bzw. eine Nukleinsäuresequenz
kodierend für eine solche, all solche Polypeptide bzw. für diese
kodierenden Nukleinsäuresequenz, die gegenüber ihrer Ausgangs-
sequenz eine Verkürzung am 5'- und/oder 3'-Ende und/oder eine
oder mehrere Deletionen aufweisen, aber nach wie vor über eine
20 Saccharoseisomerase-Aktivität verfügen, bzw. für ein Protein
mit derselben kodieren. Hierbei ist zum einen die Erzeugung
von Deletionsmutanten möglich, bei denen durch fortschreitende
Deletion vom 5'- oder vom 3'-Ende der kodierenden DNA-Sequenz
die Synthese entsprechend verkürzter Proteine erreicht werden
25 kann.

Wie oben erwähnt, können die kodierenden Sequenzen für Saccha-
roseisomerasen auch durch Signalsequenzen ergänzt sein, die für
den Transport des Genprodukts, also vorliegend des Proteins mit
30 Saccharoseisomerase-Aktivität, zu einem bestimmten Kompartiment
sorgen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sorgen Signal-
sequenzen dafür, dass die Saccharoseisomerase in die Zellwand
35 bzw. den Apoplasten der transformierten Pflanzenzellen trans-
portiert wird, d.h. die transformierten Pflanzen exprimieren eine
chimäre Saccharoseisomerase, die ein Signalpeptid für den Trans-
port in das Endoplasmatische Retikulum umfasst. Geeignete Signal-
sequenzen, die die Aufnahme in das Endoplasmatische Retikulum
40 gewährleisten, kann der Fachmann der einschlägigen Literatur
entnehmen. Besonders geeignet ist z.B. die für das Signalpeptid
des Proteinase-Inhibitor II-Gens aus Kartoffel kodierende
Sequenz (Keil et al. (1996) Nucl Acids Res 14:5641-5650; Gen-
bank Accession No. X04118). Andere geeignete Signalsequenzen
45 sorgen z.B. für die Aufnahme der Saccharoseisomerase in die
Vakuole. Hier ist als Beispiel das Signalpeptid des Patatin-Gens

aus Kartoffel (Sonnewald U et al. (1991) Plant J 1(1):95-106) zu nennen.

"Pathogenresistenz" meint das Vermindern oder Abschwächen von

5 Krankheitssymptomen einer Pflanze infolge eines Befalls durch ein Pathogen. Die Symptome können vielfältiger Art sein, umfassen aber bevorzugt solche die direkt oder indirekt zu einer Beeinträchtigung der Qualität der Pflanze, der Quantität des Ertrages, der Eignung zur Verwendung als Futter- oder Nahrungsmittel

10 führen oder aber auch Aussaat, Anbau, Ernte oder Prozessierung des Erntegutes erschweren.

"Verleihen", "bestehen", "erzeugen" oder "erhöhen" einer Pathogenresistenz meint, dass die Abwehrmechanismen einer bestimmten

15 Pflanzenart oder -sorte durch Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens im Vergleich zu dem Wildtyp der Pflanze ("Ausgangspflanze"), auf den das erfindungsgemäße Verfahren nicht angewendet wurde, unter ansonsten gleichen Bedingungen (wie beispielsweise Klima- oder Anbaubedingungen, Pathogenart etc.) eine

20 erhöhte Resistenz gegen ein oder mehrere Pathogene aufweist. Dabei äußert sich die erhöhte Resistenz bevorzugt in einer verminderten Ausprägung der Krankheitssymptome, wobei Krankheitssymptome - neben den oben erwähnten Beeinträchtigungen - auch beispielsweise die Penetrationseffizienz eines Pathogens in die

25 Pflanze oder pflanzliche Zellen oder die Proliferationseffizienz in oder auf denselben umfasst. Dabei sind die Krankheitssymptome bevorzugt um mindestens 10 % oder mindestens 20 %, besonders bevorzugt um mindestens 40 % oder 60 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 70 % oder 80 %, am meisten bevorzugt um mindestens

30 90 % oder 95 % vermindert.

"Auswahl" umfasst in Bezug auf Pflanzen, bei denen - im Unterschied oder Vergleich zur Ausgangspflanze - die Resistenz gegen mindestens ein Pathogen besteht oder erhöht ist, all die Verfahren, die eine zur Erkennung einer vorliegenden oder erhöhten Pathogenresistenz geeignet sind. Dies können Symptome der Pathogeninfektion sein (z.B. Haustorium-Ausbildung bei Pilzinfektion) aber auch die oben beschriebenen Symptome umfassen, die die Qualität der Pflanze, die Quantität des Ertrages, die

35 Eignung zur Verwendung als Futter- oder Nahrungsmittel usw. betreffen.

"Pathogen" meint im Rahmen der Erfindung beispielsweise jedoch nicht einschränkend Pilze, pilzähnliche Pathogene (wie beispielsweise Chromista; z.B. Oomyceten) sowie tierische Schädlinge wie beispielsweise Nematoden. Besonders bevorzugt sind Nematoden und Pilze. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Expression eines

Saccharoseisomerase-Proteins auch eine Resistenz gegen weitere Pathogene bewirkt.

Beispielsweise jedoch nicht einschränkend seien nachfolgende 5 Pathogene zu nennen:

1. Pilzpathogene und pilzähnliche Pathogene:

10 Pilzpathogene und pilzähnliche Pathogene (wie z.B. Chromista) umfassen biotrophe, hemibiotrophe und nekrotrophe Pilze und stammen vorzugsweise aus der Gruppe umfassend Plasmodiophora-mycota, Oomycota, Ascomycota, Chytridiomyceten, Zygomyceten, Basidiomycota und Deuteromyceten (Fungi imperfecti). Bei- 15 spielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 1 und 2 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

Tabelle 1: Pflanzliche Pilzerkrankungen

	Erkrankung	Pathogen
20	Braunrost	<i>Puccinia recondita</i>
	Gelbrost	<i>P. striiformis</i>
	Echter Mehltau	<i>Erysiphe graminis</i>
25	Spelzenbräune	<i>Septoria nodorum</i>
	Blattdürre	<i>Septoria tritici</i>
	Ährenfusariosen	<i>Fusarium spp.</i>
	Halmbruchkrankheit	<i>Pseudocercosporella herpotrichoides</i>
30	Flugbrand	<i>Ustilago spp.</i>
	Weizensteinbrand	<i>Tilletia caries</i>
	Schwarzbeinigkeit	<i>Gaeumannomyces graminis</i>
	Anthrocnoise leaf blight	<i>Colletotrichum graminicola</i> (teleomorph: <i>Glomerella graminicola</i> <i>Politis</i>); <i>Glomerella tucumanensis</i> (anamorph: <i>Glomerella falcatum</i> Went)
35	Anthracnose stalk rot	
	Aspergillus ear and kernel rot	<i>Aspergillus flavus</i>
40	Banded leaf and sheath spot ("Wurzeltöter")	<i>Rhizoctonia solani</i> Kuhn = <i>Rhizoctonia microsclerotia</i> J. Matz (telomorph: <i>Thanatephorus cucumeris</i>)
	Black bundle disease	<i>Acremonium strictum</i> W. Gams = <i>Cephalosporium acremonium</i> Auct. non Corda
45	Black kernel rot	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> = <i>Botryodiplodia theobromae</i>
	Borde blanco	<i>Marasmiellus</i> sp.

	Erkrankung	Pathogen
	Brown spot (black spot, stalk rot)	<i>Physoderma maydis</i>
5	Cephalosporium kernel rot	<i>Acremonium strictum</i> = <i>Cephalosporium acremonium</i>
	Charcoal rot	<i>Macrophomina phaseolina</i>
10	Corticium ear rot	<i>Thanatephorus cucumeris</i> = <i>Corticium sasakii</i>
	Curvularia leaf spot	<i>Curvularia clavata</i> , <i>C. eragrostidis</i> , = <i>C. maculans</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus eragrostidis</i>), <i>Curvularia inaequalis</i> , <i>C. intermedia</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus intermedius</i>), <i>Curvularia lunata</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus lunatus</i>), <i>Curvularia pallens</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus pallens</i>), <i>Curvularia senegalensis</i> , <i>C. tuberculata</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus tuberculatus</i>)
15	Didymella leaf spot	<i>Didymella exitalis</i>
20	Diplodia ear rot and stalk rot	<i>Diplodia frumenti</i> (teleomorph: <i>Botryosphaeria festucae</i>)
	Diplodia ear rot, stalk rot, seed rot and seedling blight	<i>Diplodia maydis</i> = <i>Stenocarpella maydis</i>
25	Diplodia leaf spot or streak	<i>Stenocarpella macrospora</i> = <i>Diplodialeaf macrospora</i>

Tabelle 2: Falscher Mehltau (Oomyceten)

	Erkrankung	Pathogen
	Brown stripe downy mildew	<i>Sclerotinia rayssiae</i> var. <i>zeae</i>
	Crazy top downy mildew	<i>Sclerotinia macrospora</i> = <i>Sclerospora macrospora</i>
35	Green ear downy mildew (graminicola downy mildew)	<i>Sclerospora graminicola</i>
	Java downy mildew	<i>Peronosclerospora maydis</i> = <i>Sclerospora maydis</i>
40	Philippine downy mildew	<i>Peronosclerospora philippinensis</i> = <i>Sclerospora philippinensis</i>
	Sorghum downy mildew	<i>Peronosclerospora sorghi</i> = <i>Sclerospora sorghi</i>
	Spontaneum downy mildew	<i>Peronosclerospora spontanea</i> = <i>Sclerospora spontanea</i>
45	Sugarcane downy mildew	<i>Peronosclerospora sacchari</i> = <i>Sclerospora sacchari</i>

Erkrankung	Pathogen
Dry ear rot (cob, kernel and stalk rot)	<i>Nigrospora oryzae</i> (teleomorph: <i>Khuskia oryzae</i>)
5 Ear rots, minor	<i>Alternaria alternata</i> = <i>A. tenuis</i> , <i>Aspergillus glaucus</i> , <i>A. niger</i> , <i>Aspergillus</i> spp., <i>Botrytis cinerea</i> (teleomorph: <i>Botryotinia fuckeliana</i>), <i>Cunninghamella</i> sp., <i>Curvularia pallens</i> , <i>Doratomyces stemonitis</i> = <i>Cephalotrichum stemonitis</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Gonatobotrys simplex</i> , <i>Pithomyces maydicus</i> , <i>Rhizopus microsporus</i> Tiegh., <i>R. stolonifer</i> = <i>R. nigricans</i> , <i>Scopulariopsis brumptii</i>
10	
15 Ergot (horse's tooth)	<i>Claviceps gigantea</i> (anamorph: <i>Sphacelia</i> sp.)
20 Eyespot	<i>Aureobasidium ziae</i> = <i>Kabatiella ziae</i>
Fusarium ear and stalk rot	<i>Fusarium subglutinans</i> = <i>F. moniliforme</i> var. <i>subglutinans</i>
25 Fusarium kernel, root and stalk rot, seed rot and seedling blight	<i>Fusarium moniliforme</i> (teleomorph: <i>Gibberella fujikuroi</i>)
Fusarium stalk rot, seedling root rot	<i>Fusarium avenaceum</i> (teleomorph: <i>Gibberella avenacea</i>)
30 Gibberella ear and stalk rot (Ähren- u. Stengelfäule)	<i>Gibberella ziae</i> (anamorph: <i>Fusarium graminearum</i>)
Gray ear rot	<i>Botryosphaeria ziae</i> = <i>Physalospora ziae</i> (anamorph: <i>Macrophoma ziae</i>)
35 Gray leaf spot (<i>Cercospora</i> leaf spot)	<i>Cercospora sorghi</i> = <i>C. sorghi</i> var. <i>maydis</i> , <i>C. ziae-maydis</i>
Helminthosporium root rot	<i>Exserohilum pedicellatum</i> = <i>Helminthosporium pedicellatum</i> (teleomorph: <i>Setosphaeria pedicellata</i>)
35 Hormodendrum ear rot (<i>Cladosporium</i> rot)	<i>Cladosporium cladosporioides</i> = <i>Hormodendrum cladosporioides</i> , <i>C. herbarum</i> (teleomorph: <i>Mycosphaerella tassiana</i>)
Hyalothyridium leaf spot	<i>Hyalothyridium maydis</i>
40 Late wilt	<i>Cephalosporium maydis</i>

Erkrankung	Pathogen
Leaf spots, minor	Alternaria alternata,
5	Ascochyta maydis, A. tritici,
10	A. zeicola, Bipolaris victoriae =
15	Helminthosporium victoriae =
(teleomorph: Cochliobolus victoriae),	
20	C. sativus (anamorph: Bipolaris
25	sorokiniana = H. sorokinianum =
30	H. sativum), Epicoccum nigrum,
35	Exserohilum prolatum = Drechslera
40	prolata (teleomorph: Setosphaeria
45	prolata)
50	Graphium penicillioides,
55	Leptosphaeria maydis, Leptothyrium
60	zeae, Ophiophaerella herpotricha,
65	(anamorph: Scolecosporiella sp.),
70	Paraphaeosphaeria michotii, Phoma sp.,
75	Septoria zeae, S. zeicola,
80	S. zeina
85	Northern corn leaf
90	blight (white blast,
95	crown stalk rot, stripe)
100	Setosphaeria turcica (anamorph:
105	Exserohilum turcicum = Helmin-
110	thosporium turcicum)
115	Northern corn leaf spot
120	Helminthosporium ear rot
125	(race 1)
130	Cochliobolus carbonum (anamorph:
135	Bipolaris zeicola = Helminthosporium
140	carbonum)
145	Penicillium ear rot
150	(blue eye, blue mold)
155	Penicillium spp., P. chrysogenum,
160	P. expansum, P. oxalicum
165	Phaeocytostroma stalk
170	rot and root rot
175	Phaeocytostroma ambiguum, = Phaeocyto-
180	sporella zeae
185	Phaeosphaeria leaf spot
190	Phaeosphaeria maydis = Sphaerulina
195	maydis
200	Physalospora ear rot
205	(Botryosphaeria ear rot)
210	Botryosphaeria festucae = Physalospora
215	zeicola (anamorph: Diplodia frumenti)
220	Purple leaf sheath
225	Hemiparasitic bacteria and fungi
230	Pyrenopeziza stalk rot
235	and root rot
240	Phoma terrestris =
245	Pyrenopeziza terrestris
250	Pythium root rot
255	Pythium spp., P. arrhenomanes,
260	P. graminicola
265	Pythium stalk rot
270	Pythium aphanidermatum =
275	P. butleri L.
280	Red kernel disease (ear
285	mold, leaf and seed rot)
290	Epicoccum nigrum
295	Rhizoctonia ear rot
300	(sclerotial rot)
305	Rhizoctonia zeae (teleomorph: Waitea
310	circinata)
315	Rhizoctonia root rot and
320	stalk rot
325	Rhizoctonia solani, Rhizoctonia zeae

Erkrankung	Pathogen
5 Root rots, minor	Alternaria alternata, Cercospora sorghi, Dictyochaeta fertilis, Fusarium acuminatum (teleomorph: Gibberella acuminata), F. equiseti (teleomorph: G. intricans), F. oxysporum, F. pallidoroseum, F. poae, F. roseum, G. cyanogena, (anamorph: F. sulphureum), Microdochium bolleyi, Mucor sp., Periconia circinata, Phytophthora cactorum, P. drechsleri, P. nicotianae var. parasitica, Rhizopus arrhizus
10 Rostratum leaf spot (<i>Helminthosporium</i> leaf disease, ear and stalk rot)	Setosphaeria rostrata, (anamorph: Exserohilum rostratum = <i>He/minthosporium</i> rostratum)
15 Rust, common corn	Puccinia sorghi
Rust, southern corn	Puccinia polyspora
Rust, tropical corn	Physopella pallescens, P. zae = Angiopsora zae
20 Sclerotium ear rot (southern blight)	Sclerotium rolfsii Sacc. (teleomorph: Athelia rolfsii)
25 Seed rot-seedling blight	Bipolaris sorokiniana, B. zeicola = <i>Helminthosporium</i> carbonum, Diplodia maydis, Exserohilum pedicillatum, Exserohilum turcicum = <i>Helminthosporium</i> turcicum, Fusarium avenaceum, F. culmorum, F. moniliforme, Gibberella zae (anamorph: F. graminearum), Macrohomina phaseolina, Penicillium spp., Phomopsis sp., Pythium spp., Rhizoctonia solani, R. zae, Sclerotium rolfsii, Spicaria sp.
30 Selenophoma leaf spot	Selenophoma sp.
Sheath rot	Gaeumannomyces graminis
Shuck rot	Myrothecium gramineum
35 Silage mold	Monascus purpureus, M. ruber
Smut, common	Ustilago zae = U. maydis
Smut, false	Ustilaginoidea virens
40 Smut, head	Sphacelotheca reiliana = Sporisorium holcisorghi
Southern corn leaf blight and stalk rot	Cochliobolus heterostrophus (anamorph: Bipolaris maydis = <i>Helminthosporium</i> maydis)
Southern leaf spot	Stenocarpella macrospora = Diplodia macrospora

	Erkrankung	Pathogen
5	Stalk rots, minor	Cercospora sorghi, Fusarium episphaeria, F. merismoides, F. oxysporum Schlechtend, F. poae, F. roseum, F. solani (teleomorph: Nectria haematoxocca), F. tricinctum, Mariannaea elegans, Mucor sp., Rhopographus zae, Spicaria sp.
10	Storage rots	Aspergillus spp., Penicillium spp. and other fungi
15	Tar spot	Phyllachora maydis
	Trichoderma ear rot and root rot	Trichoderma viride = T. lignorum teleomorph: Hypocrea sp.
	White ear rot, root and stalk rot	Stenocarpella maydis = Diplodia zeae
20	Yellow leaf blight	Ascochyta ischaemi, Phyllosticta maydis (teleomorph: Mycosphaerella zeae-maydis)
	Zonate leaf spot	Gloeocercospora sorghi

20 Besonders bevorzugt sind

- Plasmodiophoromycota wie Plasmodiophora brassicae (Kohlhernie, clubroot of crucifers), Spongospora subterranea (powdery scab of potato tubers), Polymyxa graminis (root disease of cereals and grasses),
- Oomycota wie Bremia lactucae (Falscher Mehltau an Salat), Peronospora (Falscher Mehltau) bei Löwenmaul (P. antirrhini), Zwiebel (P. destructor), Spinat (P. effusa), Sojabohne (P. manchurica), Tabak ("blue mold" = Blauschimmel; P. tabacina) Alfalfa und Klee (P. trifolium), Pseudoperonospora humuli (Falscher Mehltau an Hopfen), Plasmopara (Falscher Mehltau bei Trauben) (P. viticola) und Sonnenblume (P. halstedii), Sclerophythora macrospora (Falscher Mehltau bei Cerealien und Gräsern), Pythium (seed rot, seedling damping-off, and root rot and all types of plants, z.B. Wurzelbrand an Beta-Rübe durch P. debaryanum), Phytophthora infestans (Kraut- und Knollenfäule bei Kartoffel, Braunfäule bei Tomate etc.), Albugo spec. (white rust on cruciferous plants).
- Ascomycota wie Microdochium nivale (Schneeschimmel an Roggen und Weizen), Fusarium graminearum, Fusarium culmorum (Ährenfäule v.a. bei Weizen), Fusarium oxysporum (Fusarium-Welke an Tomate), Blumeria graminis (Echter Mehltau an Gerste (f.sp. hordei) und Weizen (f.sp. tritici)), Erysiphe pisi (Erbsen-

mehltau), *Nectria galligena* (Obstbaumkrebs), *Unicnula necator* (Echter Mehltau der Weinrebe), *Pseudopeziza tracheiphila* (Roter Brenner der Weinrebe), *Claviceps purpurea* (Mutterkorn an z.B. Roggen und Gräsern), *Gaeumannomyces graminis* (Schwarzbeinigkeit an Weizen, Roggen u.a. Gräsern), *Magnaporthe grisea* (rice blast disease), *Pyrenophora graminea* (Streifenkrankheit an Gerste), *Pyrenophora teres* (Netzfleckenkrankheit an Gerste), *Pyrenophora tritici-repentis* (Blattfleckenkrankheit (Blattdürre) an Weizen), *Venturia inaequalis* (Apfelschorf), *Sclerotinia sclerotium* (Weißstengeligkeit, Rapskrebs), *Pseudopeziza medicaginis* (Klappenschorf an Luzerne, Weiß- und Rotklee).

- Basidiomyceten wie *Typhula incarnata* (Typhula-Fäule an Gerste, Roggen, Weizen), *Ustilago maydis* (Beulenbrand an Mais), *Ustilago nuda* (Flugbrand an Gerste), *Ustilago tritici* (Flugbrand an Weizen, Dinkel), *Ustilago avenae* (Flugbrand an Hafer), *Rhizoctonia solani* (Wurzeltöter an Kartoffeln), *Sphacelotheca* spp. (head smut of sorghum), *Melampsora lini* (rust of flax), *Puccinia graminis* (Schwarzrost an Weizen, Gerste, Roggen, Hafer), *Puccinia recondita* (Braunrost an Weizen), *Puccinia dispersa* (Braunrost an Roggen), *Puccinia hordei* (Braunrost an Gerste), *Puccinia coronata* (Kronenrost an Hafer), *Puccinia striiformis* (Gelbrost an Weizen, Gerste, Roggen sowie zahlreichen Gräsern), *Uromyces appendiculatus* (Bohnenrost), *Sclerotium rolfsii* (root and stem rots of many plants).

- Deuteromyceten (Fungi imperfecti) wie *Septoria nodorum* (Spelzenbräune) an Weizen (*Septoria tritici*), *Pseudocercospora herpotrichoides* (Halmbruchkrankheit an Weizen, Gerste, Roggen), *Rynchosporium secalis* (Blattfleckenkrankheit an Roggen und Gerste), *Alternaria solani* (Dürrfleckenkrankheit an Kartoffel, Tomate), *Phoma betae* (Wurzelbrand an Beta-Rübe), *Cercospora beticola* (Cercospora-Blattfleckenkrankheit an Beta-Rübe), (*Alternaria brassicae* (Rapsschwärze an Raps, Kohl u.a. Kreuzblüttern), *Verticillium dahliae* (Rapswelke und -stengelfäule), *Colletotrichum lindemuthianum* (Brennfleckenkrankheit an Bohne), *Phoma lingam* - Umfallkrankheit (Schwarzbeinigkeit an Kohl; Wurzelhals- oder Stengelfäule an Raps), *Botrytis cinerea* (Grauschimmel an Weinrebe, Erdbeere, Tomate, Hopfen etc.).

Am meisten bevorzugt sind *Phytophthora infestans* (Kraut- und Knollenfäule, Braunfäule bei Tomate etc.), *Microdochium nivale* (vormals *Fusarium nivale*; Schneeschimmel an Roggen und Weizen), *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* (Ährenfäule an Weizen),

Fusarium oxysporum (Fusarium-Welke an Tomate), Blumeria graminis (Echter Mehltau an Gerste (f.sp. hordei) und Weizen (f.sp. tritici)), Magnaporthe grisea (rice blast disease), Sclerotinia sclerotiorum (Weißstengeligkeit, Rapskrebs), Septoria nodorum und 5 Septoria tritici (Spelzenbräune an Weizen), Alternaria brassicae (Rapsschwärze an Raps, Kohl u.a. Kreuzblütlern), Phoma lingam (Umfallkrankheit, Schwarzbeinigkeit an Kohl; Wurzelhals- oder Stengelfäule an Raps).

10 2. Tierische Schädlinge

Bei den im Rahmen dieser Erfindung als zur Bekämpfung bevorzugten pflanzenschädigenden Nematoden sind folgende Gruppen beispielhaft – jedoch nicht einschränkend – zu nennen:

15

a) Freilebende, wandernde Wurzelnematoden: (z.B. Pratylenchus, Xiphinema und Longidorus-Arten).

Wandernden Nematoden sind nicht an eine Parasitierungsstelle gebunden, sondern können diese wechseln. Sie können von einer Wurzel zur anderen, von einer Pflanze zur anderen und zum Teil auch im Pflanzengewebe wandern. Lange Zeit hat man ihre Bedeutung als Schädlinge unterschätzt: Heute zählen sie zu den überaus gefährlichen pflanzenschädigenden Nematoden. Viele Wachstumsschäden 20 (auch sog. "Bodenmüdigkeit") und frühzeitiges Vergilben der Kulturpflanzen konnten auf derartige Wurzelschädlinge zurückgeführt werden. Vor allem Pratylenchus Arten sind auch im Zierpflanzenbau als Ursache heftiger Wurzelschäden bekannt. Erkrankte Wurzeln sind daran zu erkennen, dass sie stellenweise braune Verfärbungen 25 aufweisen. In die hervorgerufenen Wunden dringen nachträglich auch Fäulnisorganismen ein, die ein rasches Absterben des Gewebes und tiefgehende Fäulnis an diesen Stellen zur Folge haben. Wirtschaftspflanzen sind unter anderen: div. Getreidearten, Erdäpfel, Karotten, Paradeiser, Gurken, Sellerie und Wein.

30

b) Wurzelgallenerzeugende Nematoden (z.B. Meloidogyne- Arten)

Die Larven dieser Arten bohren sich meist nahe der Spitze in die Wurzeln ein und verursachen durch Ausscheidungen ihrer Speichel- 40 drüsen Verdickungen (Gallen) des sie umgebenden Pflanzengewebes. In diesen Gallen überdauern sie und gelangen entweder aktiv oder nach Zerfall der Gallen wieder in den Boden zurück. Die Störung im Stoffwechsel der Pflanze infolge des Schädlingsbefalls macht sich in mehr oder weniger kümmerlichem Wuchs und allgemeinem 45 Kränkeln der Pflanze bemerkbar. Wurzelgallenälchen zählen vor allem in Gewächshäusern zu den größten Schädlingen, wurden aber

auch im Freiland an Karotten, Sellerie und Petersilie nachgewiesen.

c) Nematoden als Schädlinge der Blütenanlagen: (*Anguina tritici*)

5

Das Weizenälchen ist ein spezialisierter Parasit der Blütenanlage des Weizens, die sie in Gallen umwandelt. Bereits im Jungstadium der Pflanze ist der Nematodenbefall an den Wellungen oder Kräuselungen der Blätter zu erkennen.

10

d) Zystenbildende Wurzelnematoden: (*Globodera*- und *Heterodera*-Arten)

Das Kartoffelzystenälchen ist der Kartoffelfeind Nummer 1. Diese 15 Art übertrifft hinsichtlich ihrer Schädlichkeit alle anderen *Heterodera*-Arten und kann bei massiven Ausbruch bis zu 80% der Ernte vernichten. Nach dem Befall mit zystenbildenden Nematoden kümmert die Pflanze ohne äußerlich erkennbare Ursache. Erst wenn man die Wurzeln untersucht, erkennt man stecknadelkopfgroße, 20 bräunlich, gelbe oder weißliche Zysten. Die weiblichen Nematoden bohren sich in die Wurzel und sprengen durch ihren mit Eiern gefüllten und dadurch anschwellenden Hinterleib die Wurzel. Der Nematode steckt mit seinem Mundstachel noch in der Wurzel, während der prall gefüllte Hinterleib im Erdreich liegt. Das Muttertier 25 stirbt und seine sich verfestigende Haut wird zur Schutzhülle (Zyste) für die Eier und Larven. Die Zysten samt Inhalt sind sehr widerstandsfähig und können lange Zeit überdauern. Bei geeigneten Umweltbedingungen bohren sich die Larven ins Freie und befallen neue Wurzeln. Die wichtigsten zystenbildende Nematoden sind 30 Kartoffel-, Rüben-, Hafer-, Erbsen-, Klee-, Kohl-, Hopfen-, Möhrenzystenälchen (Untersuchung auf Kartoffelzystennematoden siehe auch unter: <http://www.bfl.at/>)

Als tierische Schädlinge sind insbesondere Nematoden bevorzugt. 35 Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 3 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

Tabelle 3: Parasitäre Nematoden

40

Schädigung	Pathogene Nematode
Awl	<i>Dolichodorus</i> spp., <i>D. heterocephalus</i>
Stengel- oder Stockälchen, Rübenkopfälchen ("Bulb and stem"; Europe)	<i>Ditylenchus dipsaci</i>
Burrowing	<i>Radopholus similis</i>

	Schädigung	Pathogene Nematode
	Haferzystenälchen ("Cyst")	<i>Heterodera avenae</i> , <i>H. zaeae</i> , <i>Punctodera chalcoensis</i>
5	Dagger	<i>Xiphinema spp.</i> , <i>X. americanum</i> , <i>X. mediterraneum</i>
	False root-knot	<i>Nacobbus dorsalis</i>
	Lance, Columbia	<i>Hoplolaimus columbus</i>
	Lance	<i>Hoplolaimus spp.</i> , <i>H. galeatus</i>
10	Lesion	<i>Pratylenchus spp.</i> , <i>P. brachyurus</i> , <i>P. crenatus</i> , <i>P. hexincisus</i> , <i>P. neglectus</i> , <i>P. penetrans</i> , <i>P. scribneri</i> , <i>P. thornei</i> , <i>P. zaeae</i>
	Needle	<i>Longidorus spp.</i> , <i>L. brevianulatus</i>
15	Ring	<i>Criconemella spp.</i> , <i>C. ornata</i>
	Wurzelgallenälchen ("Root-knot")	<i>Meloidogyne spp.</i> , <i>M. chitwoodi</i> , <i>M. incognita</i> , <i>M. javanica</i>
	Spiral	<i>Helicotylenchus spp.</i>
	Sting	<i>Belonolaimus spp.</i> , <i>B. longicaudatus</i>
20	Stubby-root	<i>Paratrichodorus spp.</i> , <i>P. christiei</i> , <i>P. minor</i> , <i>Quinisulcius acutus</i> , <i>Trichodorus spp.</i>
	Stunt	<i>Tylenchorhynchus dubius</i>

25 Ganz besonders bevorzugt sind *Globodera rostochiensis* und *G. pallida* (Zystenälchen an Kartoffel, Tomate u.a. Nachtschattengewächsen), *Heterodera schachtii* (Rübenzystenälchen an Zucker- und Futterrübe, Raps, Kohl etc.), *Heterodera avenae* (Haferzystenälchen an Hafer u.a. Getreidearten), *Ditylenchus dipsaci* (Stengel- oder Stockälchen, Rübenkopfälchen an Roggen, Hafer, Mais, Klee, Tabak, Rübe), *Anguina tritici* (Weizenälchen, Radekrankheit an Weizen (Dinkel, Roggen), *Meloidogyne hapla* (Wurzelgallenälchen an Möhre, Gurke, Salat, Tomate, Kartoffel, Zuckerrübe, Luzerne).

30

35

Bevorzugt wird in den einzelnen Pflanzenarten eine Resistenz gegen nachfolgende beispielhaft genannte Pilzpathogene erzielt:

40 1. Gerste: *Puccinia graminis* f.sp. *hordei* (barley stem rust), *Blumeria (Erysiphe) graminis* f.sp. *hordei* (Barley Powdery Mildew).

2. Sojabohne: *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum*, *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* (Phomopsis sojae), *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, *Sclerotium*

45

rolfsii, Cercospora kikuchii, Cercospora sojina, Peronospora manshurica, Colletotrichum dematium (Colletotrichum truncatum), Corynespora cassiicola, Septoria glycines, Phyllosticta sojicola, Alternaria alternata, Microsphaera diffussa,

5 Fusarium semitectum, Phialophora gregata, Glomerella glycines, Phakopsorapachyrhizi, Pythium aphanidermatum, Pythium ultimum, Pythium debaryanum, Fusarium solani.

3. Canola: *Albugo candida*, *Alternaria brassicae*, *Leptosphaeria maculans*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Mycosphaerella brassiccola*, *Pythium ultimum*, *Peronospora parasitica*, *Fusarium roseum*, *Alternaria alternata*.

4. Alfalfa: *Clavibacter michiganense* subsp. *insidiosum*, *Pythium ultimum*, *Pythium irregularare*, *Pythium splendens*, *Pythium debaryanum*, *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora megasperma*, *Peronospora trifoliorum*, *Phoma medicaginis* var. *medicaginis*, *Cercospora medicaginis*, *Pseudopeziza medicaginis*, *Leptotrichila medicaginis*, *Fusarium*, *Aphanomyces euteiches*, *Stemphylium herbarum*, *Stemphylium alfalfae*.

5. Weizen: *Urocystis agropyri*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum*, *Ustilago tritici*, *Ascochyta tritici*,

25 *Cephalosporium gramineum*, *Collotrichum graminicola*, *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici*, *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*, *Puccinia recondita* f.sp. *tritici*, *Puccinia striiformis*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Septoria nodorum*, *Septoria tritici*, *Septoria avenae*, *Pseudocercosporella herpotrichoides*,

30 *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia cerealis*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium arrhenomanes*, *Pythium ultimum*, *Bipolaris sorokiniana*, *Claviceps purpurea*, *Tilletia tritici*, *Tilletia laevis*, *Ustilago tritici*, *Tilletia indica*, *Rhizoctonia solani*,

35 *Pythium arrhenomanes*, *Pythium gramicola*, *Pythium aphanidermatum*, *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* (Wheat stem rust), *Blumeria* (*Erysiphe*) *graminis* f.sp. *tritici* (Wheat Powdery Mildew)

40 6. Sonnenblume: *Plasmophora halstedii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Aster Yellows*, *Septoria helianthi*, *Phomopsis helianthi*, *Alternaria helianthi*, *Alternaria zinniae*, *Botrytis cinerea*, *Phoma macdonaldii*, *Macrophomina phaseolina*, *Erysiphe cichoracearum*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus stolonifer*, *Puccinia helianthi*, *Verticillium dahliae*,

45

Cephalosporium acremonium, *Phytophthora cryptogea*, *Albugo tragopogonis*.

7. Mais: *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*, *Fusarium moniliforme*, *Gibberella zae* (*Fusarium graminearum*), *Stenocarpella maydi* (*Diplodia maydis*), *Pythium irregularare*, *Pythium debaryanum*, *Pythium graminicola*, *Pythium splendens*, *Pythium ultimum*, *Pythium aphanidermatum*, *Aspergillus flavus*, *Bipolaris maydis* O, T (*Cochliobolus heterostrophus*),

10 *Helminthosporium carbonum* I, II & III (*Cochliobolus carbonum*), *Exserohilum turcicum* I, II & III, *Helminthosporium pedicellatum*, *Physoderma maydis*, *Phyllosticta maydis*, *Kabatiella maydis*, *Cercospora sorghi*, *Ustilago maydis*, *Puccinia sorghi*, *Puccinia polysora*, *Macrophomina phaseolina*,

15 *Penicillium oxalicum*, *Nigrospora oryzae*, *Cladosporium herbarum*, *Curvularia lunata*, *Curvularia inaequalis*, *Curvularia pallens*, *Trichoderma viride*, *Claviceps sorghi*, *Cornstunt spiroplasma*, *Diplodia macrospora*, *Sclerotthora macrospora*, *Peronosclerospora sorghi*, *Peronosclerospora philippinensis*, *Peronosclerospora maydis*, *Peronosclerospora sacchari*, *Spacelotheca reiliana*, *Physopella zae*, *Cephalosporium maydis*, *Caphalosporium acremonium*.

8. Sorghum: *Exserohilum turcicum*, *Colletotrichum graminicola* (*Glomerella graminicola*), *Cercospora sorghi*, *Gloeocercospora sorghi*, *Ascochyta sorghina*, *Puccinia purpurea*, *Macrophomina phaseolina*, *Perconia circinata*, *Fusarium moniliforme*, *Alternaria alternate*, *Bipolaris sorghicola*, *Helminthosporium sorghicola*, *Curvularia lunata*, *Phoma insidiosa*, *Ramulispora sorghi*, *Ramulispora sorghicola*, *Phyllachara sacchari*, *Sporisorium reilianum* (*Sphacelotheca reiliana*), *Sphacelotheca cruenta*, *Sporisorium sorghi*, *Claviceps sorghi*, *Rhizoctonia solani*, *Acremonium strictum*, *Sclerotthora macrospora*, *Peronosclerospora sorghi*, *Peronosclerospora philippinensis*,

30 *Sclerospora graminicola*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium arrhenomanes*, *Pythium graminicola*.

Bevorzugt wird in den einzelnen Pflanzenarten eine Resistenz gegen nachfolgende beispielhaft genannte Nematodenpathogene erzielt:

Zucker- rübe	Zuckerrübenzystenälchen (Sugar beet cyst nematode)	<i>Heterodera schachtii</i>
Kartoffel	<i>Columbia</i> Wurzelgal- lenälchen (Columbia Root- knot Nematode)	<i>Meloidogyne chitwoodi</i>
	Golden Nematode	<i>Globodera rostochiensis</i>

	Nördliches Wurzelgal- lenälchen (Northern Root Knot Nema- tode)	Meloidogyne hapla
5	Potato Rot Nematode	Ditylenchus destructor
	Sojabohne	Heterodera glycines
	Mais	Heterodera zae
10	Wurzelgallenälchen (Root-Knot Nematodes)	Meloidogyne species: Meloidogyne arenaria Meloidogyne graminicola Meloidogyne chitwoodi Meloidogyne hapla Meloidogyne incognita Meloidogyne javanica
15		

"Pflanzlicher Organismus oder von diesem abgeleitete Zellen" meint allgemein jede Zelle, Gewebe, Teile oder Vermehrungsgut (wie Samen oder Früchte) eines Organismus, der zur Photosynthese befähigt ist. Eingeschlossen sind im Rahmen der Erfindung alle Gattungen und Arten höherer und niederer Pflanzen des Pflanzenreiches. Einjährige, mehrjährige, monocotyledone und dicotyledone Pflanzen sind bevorzugt. Eingeschlossen sind reife Pflanze, Saatgut, Sprosse und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut (zum Beispiel Knollen, Samen oder Früchte) und Kulturen, zum Beispiel Zell- oder Kalluskulturen. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen Entwicklungsstadium.

"Pflanze" im Rahmen der Erfindung meint alle Gattungen und Arten höherer und niederer Pflanzen des Pflanzenreiches. Eingeschlossen unter dem Begriff sind die reifen Pflanzen, Saatgut, Sprosse und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut, Pflanzenorgane, Gewebe, Protoplasten, Kallus und andere Kulturen, zum Beispiel Zellkulturen, sowie alle anderen Arten von Gruppierungen von Pflanzenzellen zu funktionellen oder strukturellen Einheiten. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen Entwicklungsstadium.

"Pflanze" umfasst alle einjährigen und mehrjährigen, monocotyledonen und dikotyledonen Pflanzen und schließt beispielhaft jedoch nicht einschränkend solche der Gattungen Cucurbita, Rosa, Vitis, Juglans, Fragaria, Lotus, Medicago, Onobrychis, Trifolium, Trigonella, Vigna, Citrus, Linum, Geranium, Manihot, Daucus,

Arabidopsis, Brassica, Raphanus, Sinapis, Atropa, Capsicum, Datura, Hyoscyamus, Lycopersicon, Nicotiana, Solarium, Petunia, Digitalis, Majorana, Cichorium, Helianthus, Lactuca, Bromus, Asparagus, Antirrhinum, Heterocallis, Nemesis, Pelargonium, 5 Panicum, Pennisetum, Ranunculus, Senecio, Salpiglossis, Cucumis, Browalia, Glycine, Pisum, Phaseolus, Lolium, Oryza, Zea, Avena, Hordeum, Secale, Triticum, Sorghum, Picea und Populus ein.

Bevorzugt sind Pflanzen nachfolgender Pflanzenfamilien: Amaranthaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Carophyllaceae, Chenopodiaceae, 10 Compositae, Cruciferae, Cucurbitaceae, Labiateae, Leguminosae, Papilionoideae, Liliaceae, Linaceae, Malvaceae, Rosaceae, Rubiaceae, Saxifragaceae, Scrophulariaceae, Solanaceae, Sterculiaceae, Tetragoniacea, Theaceae, Umbelliferae.

15 Bevorzugte monokotyle Pflanzen sind insbesondere ausgewählt aus den monokotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel der Familie der Gramineae wie Reis, Mais, Weizen oder andere Getreidearten wie Gerste, Hirse, Roggen, Triticale oder Hafer sowie dem Zuckerrohr 20 sowie alle Arten von Gräsern.

Die Erfindung wird ganz besonders bevorzugt auf dikotyledone pflanzliche Organismen angewendet. Bevorzugte dikotyle Pflanzen sind insbesondere ausgewählt aus den dikotylen Kulturpflanzen, 25 wie zum Beispiel

- Asteraceae wie Sonnenblume, Tagetes oder Calendula und andere mehr,
- 30 - Compositae, besonders die Gattung Lactuca, ganz besonders die Art sativa (Salat) und andere mehr,
- Cruciferae, besonders die Gattung Brassica, ganz besonders die Arten napus (Raps), campestris (Rübe), oleracea cv Tastie 35 (Kohl), oleracea cv Snowball Y (Blumenkohl) und oleracea cv Emperor (Broccoli) und weitere Kohlarten; und der Gattung Arabidopsis, ganz besonders die Art thaliana sowie Kresse oder Canola und andere mehr,
- 40 - Cucurbitaceae wie Melone, Kürbis oder Zucchini und andere mehr,
- Leguminosae besonders die Gattung Glycine, ganz besonders die Art max (Sojabohne) sowie Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen oder Erdnuss und andere mehr

- Rubiaceae, bevorzugt der Unterklasse Lamiidae wie beispielsweise Coffea arabica oder Coffea liberica (Kaffeestrauch) und andere mehr,
- 5 - Solanaceae besonders die Gattung Lycopersicon, ganz besonders die Art esculentum (Tomate), die Gattung Solanum, ganz besonders die Art tuberosum (Kartoffel) und melongena (Aubergine), und die Gattung Capsicum, ganz besonders die Art annum (Paprika) sowie Tabak und andere mehr,
- 10 - Sterculiaceae, bevorzugt der Unterklasse Dilleniidae wie beispielsweise Theobroma cacao (Kakastrauch) und andere mehr,
- Theaceae, bevorzugt der Unterklasse Dilleniidae wie beispielsweise Camellia sinensis oder Thea sinensis (Teestrauch) und andere mehr,
- 15 - Umbelliferae, besonders die Gattung Daucus (ganz besonders die Art carota (Karotte)) und Apium (ganz besonders die Art graveolens dulce (Selarie)) und andere mehr,
- 20 sowie Lein, Soja, Baumwolle, Hanf, Flachs, Gurke, Spinat, Möhre, Zuckerrübe und den verschiedenen Baum-, Nuss- und Weinarten, insbesondere Banane und Kiwi.
- 25 Umfasst sind ferner Schmuckpflanzen, Nutz- oder Zierbäume, Blumen, Schnittblumen, Sträucher oder Rasen. Beispielhaft aber nicht einschränkend seien zu nennen Angiospermen, Bryophyten wie zum Beispiel Hepaticae (Leberblümchen) und Musci (Moose);
- 30 Pteridophyten wie Farne, Schachtelhalm und Lycopoden; Gymnospermen wie Koniferen, Cycaden, Ginkgo und Gnetalen, die Familien der Rosaceae wie Rose, Ericaceae wie Rhododendrons und Azaleen, Euphorbiaceae wie Weihnachtssterne und Kroton, Caryophyllaceae wie Nelken, Solanaceae wie Petunien, Gesneriaceae wie das
- 35 Usambaraveilchen, Balsaminaceae wie das Springkraut, Orchidaceae wie Orchideen, Iridaceae wie Gladiolen, Iris, Freesie und Krokus, Compositae wie Ringelblume, Geraniaceae wie Geranien, Liliaceae wie der Drachenbaum, Moraceae wie Ficus, Araceae wie Philodendron und andere mehr.
- 40 Am meisten bevorzugt sind landwirtschaftliche Nutzpflanzen, die von Natur aus einen hohen Anteil an Saccharose aufweisen oder deren Wurzeln, Knollen oder Speicherwurzeln wirtschaftlich verwertet werden, wie z.B. Kartoffel, Rübe oder Zuckerrübe.
- 45 Ebenfalls bevorzugt sind Tomate, Banane, Karotte, Zuckerrohr, Erdbeere, Ananas, Papaya, Soja sowie Getreidearten wie Hafer,

Gerste, Weizen, Roggen, Triticale, Hirse und Mais. Am meisten bevorzugt sind Kartoffel, Rübe, Zuckerrübe und Zuckerrohr.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kommen Expressionskonstrukte 5 zur Expression von Proteinen mit Saccharoseisomerase-Aktivität in Pflanzen zum Einsatz. Derartige Expressionskassetten sind beispielsweise in WO 01/59136 und WO 01/59135 beschrieben, worauf hiermit ausdrücklich Bezug genommen wird.

10 In besagten Expressionskonstrukten steht ein Nukleinsäuremolekül kodierend für ein Protein mit Saccharosisomerase-Aktivität (z.B. beschrieben durch SEQ ID NO: 2 oder eines funktionellen Äquivalentes desselben oder eines funktionell äquivalenten Teils der vorgenannten) bevorzugt in funktioneller Verknüpfung 15 mit mindestens einem genetischen Kontrollelement (beispielsweise einem Promotor), das eine transgene Expression in einem pflanzlichen Organismus oder einem Gewebe, Organ, Teil oder Zelle desselben gewährleistet.

20 Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man zum Beispiel die sequentielle Anordnung eines Promoters mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz (zum Beispiel der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1) und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel einem Terminator derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der transgenen Expression der Nukleinsäuresequenz erfüllen kann. Dazu ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar 30 von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevorzugt sind Anordnungen, in denen die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz hinter der als Promoter fungierenden Sequenz positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind.

35 Die Herstellung einer funktionellen Verknüpfung als auch die Herstellung eines Expressionskonstruktes kann mittels gängiger Rekombinations- und Klonierungstechniken realisiert werden, wie sie beispielsweise in Maniatis T, Fritsch EF und Sambrook J 40 (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Silhavy TJ, Berman ML und Enquist LW (1984) Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Ausubel FM et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing 45 Assoc. and Wiley Interscience und bei Gelvin et al. (1990) In: Plant Molecular Biology Manual beschrieben sind. Zwischen beide Sequenzen können aber auch weitere Sequenzen positioniert werden,

die zum Beispiel die Funktion eines Linkers mit bestimmten Restriktionsenzymschnittstellen, einer att-Sequenz für Rekombinasen oder eines Signalpeptides haben. Auch kann die Insertion von Sequenzen zur Expression von Fusionsproteinen führen. Bevorzugt kann das transgene Expressionskonstrukt, bestehend aus einer Verknüpfung von Promoter und zu exprimierender Nukleinsäuresequenz, integriert in einem Vektor vorliegen und durch zum Beispiel Transformation in ein pflanzliches Genom insertiert werden.

10

Unter einem Expressionskonstrukt sind aber auch solche Konstruktionen zu verstehen, bei denen die Nukleinsäuresequenz kodierend für das Proteins mit Saccharosisomerase-Aktivität (z.B. kodiert durch SEQ ID NO: 2 oder ein funktionelles Äquivalent desselben oder ein funktionell äquivalentes Teil der vorgenannten) – zum Beispiel durch eine homologe Rekombination – so hinter einen endogenen pflanzlichen Promotor platziert wird, dass dieser die transgene Expression der besagten Nukleinsäuresequenz gewährleistet.

15

Pflanzenspezifische Promotoren meint grundsätzlich jeden Promotor, der die Expression von Genen, insbesondere Fremdgenen, in Pflanzen oder Pflanzenteilen, -zellen, -geweben, -kulturen steuern kann. Dabei kann der Promotor so gewählt sein, dass die Expression konstitutiv erfolgt oder nur in einem bestimmten Gewebe oder Organ, zu einem bestimmten Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung und/oder zu einem durch äußere Einflüsse, biotische oder abiotische Stimuli bestimmten Zeitpunkt (induzierte Genexpression). In Bezug auf die zu transformierende Pflanze kann der Promotor homolog oder heterolog sein. Bevorzugt sind:

a) Konstitutive Promotoren

35 "Konstitutive" Promotoren meint solche Promotoren, die eine Expression in zahlreichen, bevorzugt allen, Geweben über einen größeren Zeitraum der Pflanzenentwicklung, bevorzugt zu allen Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung, gewährleisten (Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202). Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der Promotor des 35S-Transkriptes des CaMV Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294; Odell et al. (1985) Nature 313:810-812; Shewmaker et al. (1985) Virology 140:281-288; Gardner et al. (1986) Plant Mol Biol 6:221- 228) oder der 19S CaMV Promotor (US 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202). Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor

ist der LeguminB-Promotor (GenBank Acc.-No. X03677), der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobacterium, der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus Agrobacterium, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al. (1995) Plant Mol Biol 29:637-649), der Ubiquitin 1 Promotor (Christensen et al. (1992) Plant Mol Biol 18:675-689; Bruce et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:9692-9696), der Smas Promotor, der Cinnamylalkoholdehydrogenase-Promotor (US 5,683,439), die Promotoren der vakuolärer ATPase Unter-
5 einheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991), sowie weitere Promotoren von Genen, deren konstitutive Expression in Pflanzen dem Fachmann bekannt ist. Als konstitutiver Promotor insbesondere bevorzugt ist der Promotor des Nitrilase-1 (nit1) Gens aus
10 15 A. thaliana (GenBank Acc.-No.: Y07648.2, Nukleotide 2456-4340, Hillebrand et al. (1996) Gene 170:197-200).

b) Gewebespezifische Promotoren
20 Bevorzugt sind ferner Promotoren mit Spezifitäten für die Blätter, Stengel, Wurzeln oder Samen.

Samenspezifische Promotoren wie zum Beispiel der Promotor des Phaseolins (US 5,504,200; Bustos MM et al. (1989) Plant Cell 1(9):839-53; z.B. aus Phaseolus vulgaris; van der Geest et al. (1996) Plant Mol Biol 32:579-588), des 2S Albumins (Joseffson LG et al. (1987) J Biol Chem 262:12196-12201), des Legumins (Shirsat A et al. (1989) Mol Gen Genet 215(2):326-331), des USP (unknown seed protein; Bäumlein H et al. (1991) Mol Gen Genet 225(3):459-467; Phillips et al. (1997) EMBO J 16:4489-4496), des Napin Gens (US 5,608,152; Stalberg K et al. (1996) L Planta 199:515-519), des Saccharosebinde-
25 30 35 proteins (WO 00/26388), der Hordein-Promotor (Brandt et al. (1985) Carlsberg Res. Commun. 50:333-345) oder der Legumin B4-Promotor (LeB4; Bäumlein H et al. (1991) Mol Gen Genet 225:121-128; Bäumlein H et al. (1992) Plant J 2(2):233-239; Fiedler U et al. (1995) Biotechnology (NY) 13(10):1090f), der Oleosin-Promoter aus Arabidopsis (WO 98/45461), der Bce4-Promoter aus Brassica (WO 91/13980).

40 45 Weitere geeignete samenspezifische Promotoren sind die der Gene kodierend für das "High Molecular Weight Glutenin" (HMWG), Gliadin, Verzweigungsenzym, ADP Glucose Pyro-phosphatase (AGPase), der Napin-Promotor, der ACP-Promotor und die FatB3- und FatB4-Promotoren, der Promotor der Stärke-synthase oder anderer Stärke bildender/modifizierender Enzyme wie z.B. Promotoren von Genen die für Verzweigungsenzyme

kodieren (WO 92/14827, WO 92/11375). Bevorzugt sind ferner Promotoren, die eine samenspezifische Expression in Mono-
kotyledonen wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis etc.
erlauben. Vorteilhaft eingesetzt werden können der Promoter
5 des lpt2 oder lpt1-Gen (WO 95/15389, WO 95/23230) oder
die Promotoren beschrieben in WO 99/16890 (Promotoren des
Hordein-Gens, des Glutelin-Gens, des Oryzin-Gens, des
Prolamin-Gens, des Gliadin-Gens, des Glutelin-Gens, des
Zein-Gens, des Kasirin-Gens oder des Secalin-Gens). Weitere
10 samenspezifische Promotoren sind beschrieben in WO 89/03887.

- Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren wie beispielsweise der Patatin Promotor Klasse I (B33), der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel.
15 Besonders bevorzugt ist dabei der B33-Promotor des Klasse I Patatin-Gens aus Solanum tuberosum (Rocha-Sosa et al. (1989) EMBO J 8:23-29). Der Promotor des Klasse I Patatin-Gens ist in Knollen ca. 100 bis 1000 mal aktiver als in Blättern (Rocha-Sosa et al., vide supra). Weitere Gene mit knollenspezifischer oder zumindest in Knollen verstärkter Expression sind bekannt (z.B. der Promotor der ADP-Glukose-Pyrophosphorylase-Gene; Müller et al. (1990) Mol Gen Genet 224:136-146).
- Blattspezifische Promotoren wie Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO 97/05900), der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bis-phosphatcarboxylase; US 4,962,028) oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al. (1989) EMBO J 8:2445-2451). Ganz besonders bevorzugt sind epidermis-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der Promotor des OXLP-Gens ("Oxalat-Oxidase like protein"; Wei et al. (1998) Plant Mol Biol 36:101-112).

35 c) Chemisch induzierbare Promotoren

Die transgenen Expressionskonstrukte können auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten (Übersichtsartikel: Gatz et al. (1997) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48:89-108), durch den die Expression des exogenen Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), ein durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzolsulfonamid-induzierbarer Promotor (EP 0 388 186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J
40 45

2:397-404), ein durch Abscisinsäure induzierbarer Promotor (EP 0 335 528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer Promotor (WO 93/21334) können ebenfalls verwendet werden.

5

d) Entwicklungsabhängige Promotoren

Weitere geeignete Promotoren sind beispielsweise Fruchtreifung-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der Fruchtreifung-spezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794, EP 409 625). Entwicklungsabhängige Promotoren schließt zum Teil die Gewebespezifischen Promotoren ein, da die Ausbildung einzelner Gewebe naturgemäß entwicklungsabhängig erfolgt.

15 e) Stress- oder Pathogen-induzierbare Promotoren

Ferner sind Promotoren bevorzugt, die durch biotischen oder abiotischen Stress induziert werden wie beispielsweise der pathogen-induzierbare Promotor des PRP1-Gens (Ward et al. 20 (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), der hitzeinduzierbare hsp70- oder hsp80-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare alpha-Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814) oder der licht-induzierbare PPDK Promotor.

25 Pathogen-induzierbare Promotoren umfassen die Promotoren von Genen, die infolge eines Pathogenbefalls induziert werden wie beispielsweise Gene von PR-Proteinen, SAR-Proteinen, β -1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) Neth J Plant Pathol 89:245-254; Uknas et al. 30 (1992) Plant Cell 4:645-656; Van Loon (1985) Plant Mol Viral 4:111-116; Marineau et al. (1987) Plant Mol Biol 9:335-342; Matton et al. (1987) Molecular Plant-Microbe Interactions 2:325-342; Somssich et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:2427-2430; Somssich et al. (1988) Mol Gen Genetics 35 2:93-98; Chen et al. (1996) Plant J 10:955-966; Zhang and Sing (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:2507-2511; Warner, et al. (1993) Plant J 3:191-201; Siebertz et al. (1989) Plant Cell 1:961-968 (1989).

40 Umfasst sind auch verwundungs-induzierbare Promotoren wie der des pinII Gens (Ryan (1990) Ann Rev Phytopath 28:425-449; Duan et al. (1996) Nat Biotech 14:494-498; EP-A 375 091), des wun1 und wun2-Gens (US 5,428,148), des win1- und win2-Gens (Stanford et al. (1989) Mol Gen Genet 215:200-208), des 45 Systemin Gens (McGurl et al. (1992) Science 225:1570-1573), des WIP1-Gens (Rohmeier et al. (1993) Plant Mol Biol 22:783-792; Eckelkamp et al. (1993) FEBS Letters 323:73-76),

des MPI-Gens (Corderok et al. (1994) Plant J 6(2):141-150) und dergleichen.

5 Besonders bevorzugt sind Promotoren, die speziell in Nährzellsystemen (Syncytien) nach Nematodenbefall induziert werden. Beispielhaft seien zu nennen

10 i) der Δ 0.3 TobRB7 Promotor aus Tabak (Opperman et al. (1994) Science 263: 221-223), insbesondere der durch SEQ ID NO: 24 beschriebene Promotor,

15 ii) der Lemmi9 Promotor aus Tomate (Escobar et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12: 440-449), insbesondere der durch SEQ ID NO: 23 beschriebene Promotor, sowie

iii) Geminivirus V-sense Promotoren (WO 00/01832), insbesondere die durch SEQ ID NO: 32, 33 oder 34 beschriebenen Promotoren.

20 Weitere im Rahmen dieser Erfindung bevorzugte nematoden-induzierbare Promotoren sind in WO 98/22599 beschrieben. Insbesondere bevorzugt sind dabei die regulatorischen Bereiche (d.h. die dem ATG-Startkodon vorgelagerten Bereiche) der Sequenzen mit den GenBank Acc.-No.: A91914 (Basenpaare 1 bis 3480). Ferner bevorzugt sind die in US 6,395,963 beschriebenen Promotorsequenzen, die in WO 03/033651 beschriebenen Promotorsequenzen, die in JP 2001508661-A beschriebenen Promotorsequenzen (insbesondere die Sequenz mit den GenBank Acc.-No.: BD056958), sowie die in WO 97/46692 beschriebenen Promotorsequenzen (insbesondere die Sequenz mit den GenBank Acc.-No.: A79355; Basenpaare 1 bis 2127, oder 1 bis 2160). Weitere nematoden-induzierbare Promotoren können von Genen abgeleitet werden, deren Induktion infolge eines Nematodenbefalls beschrieben ist. Beispielhaft - jedoch nicht einschränkend - sind zu nennen: Der Pollenin Promotor (Karimi M et al. (2002) J Nematol 34(2):75-79) sowie der Promotor einer putativen Rezeptor Serin/Threonin Proteinkinase (Custers JHHV et al. (2002) Mol Plant Pathol 3(4):239-249).

40 Besonders bevorzugt sind pathogen- oder stress-induzierbare, sowie Samen-, Knolle-, Wurzel-, Blatt- und/oder Stengel-spezifische, wobei pathogen-induzierbare (insbesondere die oben spezifisch genannten nematoden-induzierbaren Promotoren) am meisten bevorzugt sind.

45 Ein weiterer - besonders bevorzugter - Gegenstand der Erfindung betrifft Expressionskonstrukte, in denen eine Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Protein mit Saccharoseisomerase Aktivität in

funktioneller Verknüpfung mit einem stress-, pathogen-, oder verwundungs-induzierbaren Promotor steht. Stress-, pathogen oder verwundungs-induzierbare Promotoren meint allgemein all solche Promotoren, die durch biotischen oder abiotischen Stress 5 induziert werden können. Abiotischer Stress meint dabei Stimuli wie Hitze, Kälte, Trockenheit, Frost, Feuchte, Salz, UV-Licht usw. Biotischer Stress meint dabei den Befall durch ein Pathogen, wobei der Begriff "Pathogen" all die oben genannten Pathogene umfasst. Dabei hat der Stimulus bevorzugt eine Stärke, die zu 10 einem Ertragsrückgang von mindestens 5 % im Vergleich zu durchschnittlichen Ertragswerten führt. Induzierbar meint dabei eine Erhöhung der Transkriptionsaktivität um mindestens 50 %, bevorzugt mindestens 100 %, besonders bevorzugt mindestens 500 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 1000 %, am meisten bevorzugt 15 mindestens 5000 % im Vergleich zu der Expressionsaktivität einer nicht-stimulierten Pflanze. Stress- oder pathogen-induzierbare Promotoren umfassen beispielhaft, jedoch nicht einschränkend den pathogen-induzierbaren Promotor des PRP1-Gens (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), den hitzeinduzierbaren hsp70- oder 20 hsp80-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), den kälteinduzierbaren α -Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814), den licht-induzierbaren PPDK Promotor oder den verwundungs-induzierbaren pinII-Promoter (EP-A 0 375 091). Bevorzugt sind insbesondere pathogen-induzierbare Promotoren wie z.B. die Promotoren der 25 PR-Proteine, SAR-Proteine, β -1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) Neth J Plant Pathol 89:245-254; Uknnes, et al. (1992) The Plant Cell 4:645-656; Van Loon (1985) Plant Mol Viral 4:111-116; Marineau et al. (1987) Plant Mol Biol 9:335-342; Matton et al. (1987) Molecular Plant-Microbe Inter- 30 actions 2:325-342; Somssich et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:2427-2430; Somssich et al. (1988) Mol Gen Genetics 2:93-98; Chen et al. (1996) Plant J 10:955-966; Zhang and Sing (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:2507-2511; Warner, et al. (1993) Plant J 3:191-201; Siebertz et al. (1989) Plant Cell 1:961-968). Umfasst 35 sind auch verwundungs-induzierbare Promotoren wie der des pinII Gens (Ryan (1990) Ann Rev Phytopath 28:425-449; Duan et al. (1996) Nat Biotech 14:494-498), des wun1- und wun2-Gens (US 5,428,148), des win1- und win2-Gens (Stanford et al. (1989) Mol Gen Genet 215:200-208), des Systemin-Gens (McGurl et al. (1992) 40 Science 225:1570-1573), des WIP1-Gens (Rohmeier et al. (1993) Plant Mol Biol 22:783-792; Eckelkamp et al. (1993) FEBS Letters 323:73-76), des MPI-Gens (Corderok et al. (1994) Plant J 6(2):141-150) und dergleichen. Verwundungs-induzierbare Promotoren sind bei Befall durch Fraßpathogene vorteilhaft einzusetzen.

Der Durchschnittsfachmann kann darüber hinaus ohne weiteres zusätzliche Beispiele für Gene mit stress-, pathogen- oder verwundungs-induzierten Expressionsmustern der Literatur entnehmen. Ferner ist der Durchschnittsfachmann in der Lage, 5 mittels Routinemethoden weitere geeignete Promotoren zu isolieren. So kann der Fachmann mit Hilfe gängiger molekularbiologischer Methoden, z.B. Hybridisierungsexperimenten oder DNA-Protein-Bindungsstudien entsprechende regulatorische Nukleinsäureelemente identifizieren. Dabei wird z.B. in einem ersten 10 Schritt eine differentielle Expressionsbibliothek von beispielsweise pathogen-infizierten/befallenen und "normalem" Geweben angelegt. Anschließend werden mit Hilfe der so identifizierten pathogen-induzierten cDNAs Promotoren isoliert, die über pathogen-induzierbare regulatorische Elemente verfügen. Dem Fachmann 15 stehen darüber hinaus weitere auf PCR basierende Methoden für die Isolierung geeigneter stress-, pathogen- oder verwundungs-induzierter Promotoren zur Verfügung.

Besonders bevorzugt sind gewebespezifische Promotoren, 20 insbesondere samenspezifische, knollenspezifische, fruchtspezifische und blattspezifische Promotoren sowie pathogen-induzierte Promotoren.

Ganz besonders bevorzugt sind pathogeninduzierte Promotoren, insbesondere Nematoden-induzierte Promotoren.

25 Es können ferner weitere Promotoren funktionell mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz verknüpft sein, die eine transgene Expression in weiteren Pflanzengeweben oder in anderen Organismen, wie zum Beispiel E.coli Bakterien 30 ermöglichen. Als Pflanzenpromotoren kommen im Prinzip alle oben beschriebenen Promotoren in Frage.

Die in den Expressionskonstrukten oder Expressionsvektoren enthaltenen Nukleinsäuresequenzen können mit weiteren genetischen 35 Kontrollsequenzen neben einem Promoter funktionell verknüpft sein. Der Begriff der genetischen Kontrollsequenzen ist breit zu verstehen und meint all solche Sequenzen, die einen Einfluss auf das Zustandekommen oder die Funktion eines Expressionskonstruktes haben. Genetische Kontrollsequenzen modifizieren zum 40 Beispiel die Transkription und Translation in prokaryotischen oder eukaryotischen Organismen. Vorzugsweise umfassen die Expressionskonstrukte 5'-stromaufwärts von der jeweiligen transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz einen pflanzen-spezifischen Promoter und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz 45 als zusätzliche genetische Kontrollsequenz, sowie gegebenenfalls

weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils funktionell verknüpft mit der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz.

Genetische Kontrollsequenzen umfassen auch weitere Promotoren, 5 Promotorelemente oder Minimalpromotoren, die die expressionssteuernden Eigenschaften modifizieren können. So kann durch genetische Kontrollsequenzen zum Beispiel die gewebespezifische Expression zusätzlich abhängig von bestimmten Stressfaktoren erfolgen. Entsprechende Elemente sind zum Beispiel für Wasser- 10 stress, Abscisinsäure (Lam E und Chua NH (1991) J Biol Chem 266(26):17131- 17135) und Hitzestress (Schoffl F et al. (1989) Mol Gen Genetics 217(2-3):246-53) beschrieben.

Genetische Kontrollsequenzen umfassen ferner auch die 5'-untrans- 15 latierte Regionen, Introns oder nichtkodierende 3'-Region von Genen wie beispielsweise das Actin-1 Intron, oder die Adh1-S Introns 1, 2 und 6 (allgemein: The Maize Handbook, Chapter 116, Freeling and Walbot, Eds., Springer, New York (1994)). Es ist gezeigt worden, dass diese eine signifikante Funktionen bei 20 der Regulation der Genexpression spielen können. So wurde gezeigt, dass 5'-untranslatierte Sequenzen die transiente Expression heterologer Gene verstärken können. Beispielsweise für Translationsverstärker sei die 5'-Leadersequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus zu nennen (Gallie et al. (1987) Nucl Acids 25 Res 15:8693-8711) und dergleichen. Sie können ferner die Gewebespezifität fördern (Rouster J et al. (1998) Plant J 15:435-440).

Das transgene Expressionskonstrukt kann vorteilhafterweise eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell ver- 30 knüpft mit dem Promoter enthalten, die eine erhöhte transgene Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden, wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die trans- 35 gen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

Als Kontrollsequenzen geeignete Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, 40 die im wesentlichen T-DNA Polyadenylierungssignale aus Agrobacterium tumefaciens umfassen. Beispiele für besonders geeignete Terminatorsequenzen sind der OCS (Octopin-Synthase)-Terminator und der NOS (Nopaline-Synthase)-Terminator.

45 Als Kontrollsequenzen sind weiterhin solche zu verstehen, die eine homologe Rekombination bzw. Insertion in das Genom eines Wirtsorganismus ermöglichen oder die Entfernung aus dem Genom

erlauben. Bei der homologen Rekombination kann zum Beispiel die kodierende Sequenz eines bestimmten endogenen Gens gegen die für eine Saccharoseisomerase kodierende Sequenz gezielt ausgetauscht werden.

5

Ein transgenes Expressionskonstrukt und/oder die von ihm abgeleiteten transgenen Expressionsvektoren können weitere Funktionselemente enthalten. Der Begriff Funktionselement ist breit zu verstehen und meint all solche Elemente, die einen Einfluss 10 auf Herstellung, Vermehrung oder Funktion der erfindungsgemäßen transgenen Expressionskonstrukte, der transgenen Expressionsvektoren oder der transgenen Organismen haben. Beispielhaft aber nicht einschränkend seien zu nennen:

15 a) Selektionsmarker, die eine Resistenz gegen Biozide z.B. Metabolismusinhibitoren (wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456), Antibiotika (wie z.B. Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin) oder Herbizide (wie Glyphosat oder Phosphinotricin) verleihen.

20

Besonders bevorzugte Selektionsmarker sind solche, die eine Resistenz gegen Herbizide verleihen. Beispielhaft seien genannt: DNA Sequenzen, die für Phosphinothricinacetyltransferasen (PAT) kodieren und Glutaminsynthaseinhibitoren 25 inaktivieren (bar und pat Gen), 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphatsynthasegene (EPSP Synthasegene), die eine Resistenz gegen Glyphosat® (N-(phosphonomethyl)glycin) verleihen, das für das Glyphosat® degradierende Enzyme kodierende gox Gen (Glyphosatoxidoreduktase), das deh Gen (kodierend für eine 30 Dehalogenase, die Dalapon inaktiviert), Sulfonlurea- und Imidazolinon inaktivierende Acetolactatsynthasen sowie bxn Gene, die für Bromoxynil degradierende Nitrilaseenzyme 35 kodieren, das aasa-Gen, das eine Resistenz gegen das Antibiotikum Apectinomycin verleiht, das Streptomycinphosphotransferase (spt) Gen, das eine Resistenz gegen Streptomycin gewährt, das Neomycinphosphotransferase (nptII) Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin oder Geneticin (G418) verleiht, das Hygromycinphosphotransferase (hpt) Gen, das eine Resistenz 40 gegen Hygromycin vermittelt, das Acetolactatsynthase Gen (als), das eine Resistenz gegen Sulfonlharnstoff-Herbizide verleiht (z.B. mutierte ALS-Varianten mit z.B. der S4 und/oder Hra Mutation).

45 b) Reportergene, die für leicht quantifizierbare Proteine kodieren und über Eigenfarbe oder Enzymaktivität eine Bewertung der Transformationseffizienz oder des Expressionsortes oder -zeitpunktes gewährleisten. Ganz besonders

bevorzugt sind dabei Reporter-Proteine (Schenborn E, Groskreutz D. Mol Biotechnol. 1999; 13(1):29-44) wie das "green fluorescence protein" (GFP) (Sheen et al. (1995) Plant Journal 8(5):777-784), Chloramphenicoltransferase, 5 Luziferase (Ow et al. (1986) Science 234:856-859), Aequorin (Prasher et al. (1985) Biochem Biophys Res Commun 126(3):1259-1268), β -Galactosidase, ganz besonders bevorzugt ist β -Glucuronidase (Jefferson et al. (1987) EMBO J 6:3901-3907).

10 c) Replikationsursprünge, die eine Vermehrung der erfindungsgemäßen transgenen Expressionskonstrukte oder transgenen Expressionsvektoren in zum Beispiel E.coli gewährleisten. Beispielhaft als ORI ("origin of DNA replication") seien 15 genannt der pBR322 ori oder der P15A ori (Sambrook et al.: Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

20 d) Elemente, die für eine Agrobakterium-vermittelte Pflanzentransformation erforderlich sind, wie zum Beispiel die rechte oder linke Begrenzung der T-DNA oder die vir-Region.

Zur Selektion erfolgreich transformierter Zellen ist es in der Regel erforderlich, einen selektionierbaren Marker zusätzlich einzuführen, der den erfolgreich rekombinierten Zellen 25 eine Resistenz gegen ein Biozid (zum Beispiel ein Herbizid), einen Metabolismusinhibitor wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456) oder ein Antibiotikum verleiht. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion der transformierten Zellen von 30 untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84).

Die Einführung eines erfindungsgemäßen Expressionskonstrukt in einen Organismus oder Zellen, Geweben, Organe, Teile bzw. Samen 35 desselben (bevorzugt in Pflanzen bzw. pflanzliche Zellen, Gewebe, Organe, Teile oder Samen) kann vorteilhaft unter Verwendung von Vektoren realisiert werden, in denen die transgenen Expressionskonstrukte enthalten sind. Vektoren können beispielhaft Plasmide, Cosmide, Phagen, Viren oder auch Agrobakterien sein. Das trans- 40 gene Expressionskonstrukt kann in den Vektor (bevorzugt ein Plasmidvektor) über eine geeignete Restriktionsschnittstelle oder eine Rekombinase att-Sequenz eingeführt werden. Der entstandene transgene Expressionsvektor wird zunächst in E.coli eingeführt. Korrekt transformierte E.coli werden selektioniert, gezüchtet 45 und der rekombinante Vektor mit den dem Fachmann geläufigen Methoden gewonnen. Restriktionsanalyse und Sequenzierung können dazu dienen, den Klonierungsschritt zu prüfen. Bevorzugt sind

solche Vektoren, die eine stabile Integration des transgenen Expressionskonstruktes in das pflanzliche Genom ermöglichen.

Die Herstellung eines transformierten Organismus (bzw. einer transformierten Zelle oder Gewebes) erfordert, dass die entsprechende DNA (z.B. der Expressionsvektor) oder RNA in die entsprechende Wirtszelle eingebracht wird. Für diesen Vorgang, der als Transformation (oder Transduktion bzw. Transfektion) bezeichnet wird, steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung (Keown et al. (1990) *Methods in Enzymology* 185:527-537). So kann die DNA oder RNA beispielhaft direkt durch Mikroinjektion oder durch Bombardierung mit DNA-beschichteten Mikropartikeln eingeführt werden. Auch kann die Zelle chemisch, zum Beispiel mit Polyethylenglycol, permeabilisiert werden, so dass die DNA durch Diffusion in die Zelle gelangen kann. Die DNA kann auch durch Protoplastenfusion mit anderen DNA-enthaltenden Einheiten wie Minicells, Zellen, Lysosomen oder Liposomen erfolgen. Elektroporation ist eine weitere geeignete Methode zur Einführung von DNA, bei der die Zellen reversibel durch einen elektrischen Impuls permeabilisiert werden. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (beispielsweise bei Bilang et al. (1991) *Gene* 100:247-250; Scheid et al. (1991) *Mol Gen Genet* 228:104-112; Guerche et al. (1987) *Plant Science* 52:111-116; Neuhouse et al. (1987) *Theor Appl Genet* 75:30-36; Klein et al. (1987) *Nature* 327:70-73; Howell et al. (1980) *Science* 208:1265; Horsch et al. (1985) *Science* 227:1229- 1231; DeBlock et al. (1989) *Plant Physiology* 91:694-701; *Methods for Plant Molecular Biology* (Weissbach and Weissbach, eds.) Academic Press Inc. (1988); and *Methods in Plant Molecular Biology* (Schuler and Zielinski, eds.) Academic Press Inc. (1989)).

Bei Pflanzen werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind vor allem die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone, die sogenannte "particle bombardment" Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung und die Mikroinjektion.

Neben diesen "direkten" Transformationstechniken kann eine Transformation auch durch bakterielle Infektion mittels *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* durchgeführt werden. Die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation ist am besten für dicotyledone Pflanzenzellen geeignet. Die Verfahren sind bei-

spielsweise beschrieben bei Horsch RB et al. (1985). Science 225: 1229f).

Werden Agrobakterien verwendet, so ist das transgene Expressions-
5 konstrukt in spezielle Plasmide zu integrieren, entweder in
einen Zwischenvektor (englisch: shuttle or intermediate vector)
oder einen binären Vektor. Wird ein Ti oder Ri Plasmid zur
Transformation verwendet, ist zumindest die rechte Begrenzung,
meistens jedoch die rechte und die linke Begrenzung der Ti oder
10 Ri Plasmid T-DNA als flankierende Region mit dem einzuführenden
transgenen Expressionskonstrukt verbunden.

Bevorzugt werden binäre Vektoren verwendet. Binäre Vektoren
können sowohl in E.coli als auch in Agrobacterium replizieren.
15 Sie enthalten in der Regel ein Selektionsmarkergen für die
Selektion transformierter Pflanzen (z.B. das nptII Gen, das eine
Resistenz gegen Kanamycin verleiht) und einen Linker oder Poly-
linker flankiert von der rechten und linken T-DNA Begrenzungs-
sequenz. Außerhalb der T-DNA-Begrenzungssequenz enthalten sie
20 zudem noch einen Selektionsmarker, der eine Selektion trans-
formierter E.coli und/oder Agrobakteria ermöglicht (z.B. das
nptIII Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin verleiht). Ent-
sprechende Vektoren können direkt in Agrobacterium transformiert
werden (Holsters et al. (1978) Mol Gen Genet 163:181-187).

25 Das in diesem Fall als Wirtsorganismus fungierende Agrobacterium
sollte bereits ein Plasmid mit der vir-Region enthalten. Diese
ist für die Übertragung der T-DNA auf die pflanzliche Zelle
erforderlich. Ein so transformiertes Agrobacterium kann zur
30 Transformation pflanzlicher Zellen verwendet werden. Die Ver-
wendung von T-DNA zur Transformation pflanzlicher Zellen ist
intensiv untersucht und beschrieben (EP 120 516; Hoekema, In:
The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V.,
Alblasserdam, Chapter V; An et al. (1985) EMBO J 4:277-287).
35 Verschiedene binäre Vektoren sind bekannt und teilweise kommer-
ziell erhältlich wie zum Beispiel pBI101.2 oder pBIN19 (Clontech
Laboratories, Inc. USA).

40 Direkte Transformationstechniken eignen sich für jeden Organis-
mus und Zelltyp. Im Falle von Injektion oder Elektroporation
von DNA bzw. RNA in pflanzliche Zellen werden keine besonderen
Anforderungen an das verwendete Plasmid gestellt. Einfache
Plasmide wie die der pUC-Reihe können verwendet werden. Sollen
vollständige Pflanzen aus den transformierten Zellen regeneriert
45 werden, so ist es vorteilhaft, wenn sich auf dem Plasmid ein
zusätzliches selektionierbares Markergen befindet.

Stabil transformierte Zellen d.h. solche, die die eingeführte DNA integriert in die DNA der Wirtszelle enthalten, können von untransformierten selektioniert werden, wenn ein selektionierbarer Marker Bestandteil der eingeführten DNA ist. Als Marker kann beispielhaft jedes Gen fungieren, dass eine Resistenz gegen Antibiotika oder Herbizide (wie Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin oder Phosphinotricin etc.) zu verleihen vermag (s.o.). Transformierte Zellen, die ein solches Markergen exprimieren, sind in der Lage, in der Gegenwart von Konzentrationen eines entsprechenden Antibiotikums oder Herbicides zu überleben, die einen untransformierten Wildtyp abtöten. Beispiel sind oben genannt und umfassen bevorzugt das bar Gen, dass Resistenz gegen das Herbizid Phosphinotricin verleiht (Rathore KS et al. (1993) Plant Mol Biol 21(5):871-884), das nptII Gen, dass Resistenz gegen Kanamycin verleiht, das hpt Gen, das Resistenz gegen Hygromycin verleiht, oder das EPSP-Gen, das Resistenz gegen das Herbizid Glyphosat verleiht. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion von transformierten Zellen von untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84). Die erhaltenen Pflanzen können in üblicher Weise gezüchtet und gekreuzt werden. Zwei oder mehr Generationen sollten kultiviert werden, um sicherzustellen, dass die genomische Integration stabil und vererblich ist.

Die oben genannten Verfahren sind beispielsweise beschrieben in Jenes B et al. (1993) Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von SD Kung und R Wu, Academic Press, S.128-143 sowie in Potrykus (1991) Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol 42:205-225. Vorgezugsweise wird das Expressionskonstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al. (1984) Nucl Acids Res 12:8711f).

Sobald eine transformierte Pflanzenzelle hergestellt wurde, kann eine vollständige Pflanze unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren erhalten werden. Hierbei geht man beispielhaft von Kalluskulturen aus. Aus diesen noch undifferenzierten Zellmassen kann die Bildung von Spross und Wurzel in bekannter Weise induziert werden. Die erhaltenen Sprösslinge können ausgepflanzt und gezüchtet werden.

Dem Fachmann sind Verfahren bekannt, um aus Pflanzenzellen, Pflanzenteile und ganze Pflanzen zu regenerieren. Beispielsweise werden hierzu Verfahren beschrieben von Fennell et al. (1992) Plant Cell Rep. 11:567-570; Stoeger et al (1995) Plant Cell Rep.

44

14:273-278; Jahne et al. (1994) Theor Appl Genet 89:525-533 verwendet.

"Transgen" meint alle solche Konstruktionen und Verfahren,
5 in denen sich entweder

- a) die Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Protein mit Saccharoseisomerase-Aktivität, oder
- 10 b) eine mit besagter Nukleinsäuresequenz unter a) funktionell verknüpfte genetische Kontrollsequenz, zum Beispiel ein Promotor, oder
- c) (a) und (b)

15

sich nicht in ihrer natürlichen, genetischen Umgebung befinden oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden, wobei die Modifikation beispielhaft eine Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer 20 Nukleotidreste sein kann. Natürliche genetische Umgebung meint den natürlichen chromosomalen Locus in dem Herkunftsorganismus oder das Vorliegen in einer genomischen Bibliothek.

25

30

35

40

45

Sequenzen

1. SEQ ID NO: 1 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharose-isomerase aus *Protaminobacter rubrum*
- 5 2. SEQ ID NO: 2 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharose-isomerase aus *Protaminobacter rubrum*
- 10 3. SEQ ID NO: 3 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharose-isomerase aus Saccharoseisomerase aus *Erwinia rhabonthici* (N-terminales Fragment)
- 15 4. SEQ ID NO: 4 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharose-isomerase aus Saccharoseisomerase aus *Erwinia rhabonthici* (N-terminales Fragment)
5. SEQ ID NO: 5 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharose-isomerase aus *Erwinia rhabonthici*
- 20 6. SEQ ID NO: 6 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharose-isomerase aus *Erwinia rhabonthici*
7. SEQ ID NO: 7 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharose-isomerase aus *Protaminobacter rubrum* (Variante)
- 25 8. SEQ ID NO: 8 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharose-isomerase aus *Protaminobacter rubrum* (Variante)
9. SEQ ID NO: 9 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharose-isomerase aus *Enterobacter species SZ62*
- 30 10. SEQ ID NO: 10 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharose-isomerase aus *Enterobacter species SZ62*
- 35 11. SEQ ID NO: 11 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharose-isomerase aus *Serratia plymuthica*
12. SEQ ID NO: 12 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharose-isomerase aus *Serratia plymuthica*
- 40 13. SEQ ID NO: 13 Nukleinsäuresequenz kodierend für Fusionsprotein aus Saccharoseisomerase aus *Erwinia rhabonthici* (*palI*) und Signalpeptidsequenz des Proteinase Inhibitor II Gens

14. SEQ ID NO: 14 Aminosäuresequenz kodierend für Fusionsprotein aus Saccharoseisomerase aus *Erwinia rhabontici* (*palI*) und Signalpeptidsequenz des Proteinase Inhibitor II Gens

5 15. SEQ ID NO: 15 Nukleinsäuresequenz (vollständige cDNA mit untranslatierter Region) kodierend für Saccharoseisomerase (Isomaltulosesynthase) aus *Klebsiella* sp. LX3

10 16. SEQ ID NO: 16 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharoseisomerase (Isomaltulosesynthase) aus *Klebsiella* sp. LX3

15 17. SEQ ID NO: 17 Nukleinsäuresequenz (offenes Leseraster) kodierend für Saccharoseisomerase (Isomaltulosesynthase) aus *Klebsiella* sp. LX3

20 18. SEQ ID NO: 18 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharoseisomerase (Isomaltulosesynthase) aus *Klebsiella* sp. LX3

25 19. SEQ ID NO: 19 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharoseisomerase aus *Enterobacter* species SZ62 (Fragment)

30 20. SEQ ID NO: 20 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharoseisomerase aus *Enterobacter* species SZ62 (Fragment)

21. SEQ ID NO: 21 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharoseisomerase aus *Pseudomonas mesoacidophila* MX45 (Fragment)

35 22. SEQ ID NO: 22 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharoseisomerase aus *Pseudomonas mesoacidophila* MX45 (Fragment)

40 23. SEQ ID NO: 23 Nukleinsäuresequenz kodierend für Lemmi9-Promotor aus Tomate (*Lycopersicum esculatum*)

45 24. SEQ ID NO: 24 Nukleinsäuresequenz kodierend für $\Delta 0.3$ TobRB7 Promotorsequenz (Region: -298 bis +76) aus *Nicotiana tabacum*

25. SEQ ID NO: 25 Oligonukleotidprimer FB83
5' -GGATCCGGTACCGTTCAGCAATCAAAT-3'

5 26. SEQ ID NO: 26 Oligonukleotidprimer FB84
5' -GTCGACGTCTGCCAAAAACCTT-3'

27. SEQ ID NO: 27 Oligonukleotidprimer FB 97
5' -GTCGACCTACGTGATTAAGTTATA-3'

10 28. SEQ ID NO: 28 Oligonukleotidprimer Lem1
5' -atcGAATTCTATAATTAAACCATCTAGAG-3'

29. SEQ ID NO: 29 Oligonukleotidprimer Lem2
5' -atcGGTACCTGCTCTGGAACGAAAGGG-3'

15 30. SEQ ID NO: 30 Oligonukleotidprimer Tob1
5' -GGAATTCAAGCTTATCTAAACAAAGTTTAAATTC-3'

31. SEQ ID NO: 31 Oligonukleotidprimer Tob2
20 5' -GGGTACCAAGTTCTCACTAGAAAAATGCC-3

32. SEQ ID NO: 32 Nukleinsäuresequenz kodierend für V-sense
Promotor aus Wheat Dwarf Virus (GenBank Acc.-
No.: AX006849; Sequenz 1 aus WO 00/01832)

25 33. SEQ ID NO: 33 Nukleinsäuresequenz kodierend für V-sense
Promotor aus Maize Streak Virus (GenBank Acc.-
No.: AX006850; Sequenz 2 aus WO 00/01832)

30 34. SEQ ID NO: 34 Nukleinsäuresequenz kodierend für V-sense
Promotor aus Pepper huasteco Virus (GenBank
Acc.-No.: AX006851; Sequenz 3 aus WO 00/01832)

35. SEQ ID NO: 35 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharose-
35 isomerase aus Serratia plymuthica

36. SEQ ID NO: 36 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharose-
isomerase aus Serratia plymuthica

Abbildungen

1. Fig. 1: Schematische Darstellung der Expressionskassette im Plasmid p35S-cwIso. Bedeutung der Abkürzungen:
5 35S: 35S Cauliflower Mosaik Virus (CaMV) Promotor
SP: Signalpeptid des Proteinase-Inhibitor II-Gens
palI: Saccharoseisomerase Gen aus *Erwinia rhabontici*
OCS: Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens
EcoRI, Asp718, BamHI, SalI, HindIII: Restriktionschnittstellen
10 Detaillierte Beschreibung der einzelnen Elemente siehe unten.
2. Fig 2: Schematische Darstellung der Expressionskassette im Plasmid pB33-cwIso. Bedeutung der Abkürzungen:
15 B33: Promotor des Klasse I Patatin-Gens B33
SP: Signalpeptid des Proteinase-Inhibitor II-Gens
palI: Saccharoseisomerase Gen aus *Erwinia rhabontici*
OCS: Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens
EcoRI, Asp718, BamHI, SalI, HindIII: Restriktionschnittstellen
Detaillierte Beschreibung der einzelnen Elemente siehe unten.
20
3. Fig. 3: Westernblot-Analyse von palI exprimierenden Kartoffelknollen verschiedener transgener Linien. Pro Spur wurden 20 µg lösliches Protein auf ein SDS-Gel aufgetragen, getrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Der Filter wurden anschließend mit einem polyklonalen PalI Antikörper hybridisiert. Verglichen wurde die Expression in Knollen von Wildtyp-Kartoffelpflanzen (wt) mit der in den Kartoffellinien 5, 12, 26 und 33.
25
- 30 4. Fig. 4: HPLC-Analyse der löslichen Kohlenhydrate in Saccharoseisomerase exprimierenden Pflanzen.
A: Zuckerstandards.
B: Extrakt einer transgenen Knolle.
C: Extrakt einer Wildtypknolle.
- 35 5. Fig. 5: Gehalt an Palatinose, Saccharose, Glucose und Stärke in Wildtyp-Kartoffelknollen (wt) und Kartoffelknollen verschiedener transgener Linien (3 bis 37), die das chimäre palI Gen in der Zellwand exprimieren. Die Werte des Wildtyps (wt; gestreifte Säulen) und der transgenen Kartoffelknollen (3 bis 37; schwarze Säulen) entsprechen den Mittelwerten von vier Messungen ± Standardabweichung. Als zusätzliche Kontrolle wurde eine transgene jedoch palI nicht-exprimierende Linie (Control) analysiert.
40
45

6. Fig. 6: Infektion von Kartoffelknollen mit *Alternaria solani*. Kartoffelscheiben von Wildtyp-Knollen und Knollen der pali exprimierenden transgene Linien 5 und 33 zum Zeitpunkt 14 Tage nach Infektion mit *Alternaria solani*.

5 A: Kontrolle mit Kartoffelscheiben von Wildtyp (wt)- und transgenen Knollen (Linien 5 und 33) nach 14-tägiger Inkubation ohne vorherige *Alternaria* Infektion.

B: Wildtypknollen; 14 Tage nach *Alternaria* Infektion

10 C: Transgene Linie-5; 14 Tage nach *Alternaria* Infektion

D: Transgene Linie-33; 14 Tage nach *Alternaria* Infektion

7. Fig. 7: Schematische Darstellung der Expressionskassette im Plasmid pLemmi9-cwIso. Bedeutung der Abkürzungen:
 Lemmi9: Lemmi9-Promotor aus Tomate (*Lycopersicon esculentum*)
 15 SP: Signalpeptid des Proteinase-Inhibitor II-Gens
 pali: Saccharoseisomerase Gen aus *Erwinia rhamphontici*
 OCS: Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens
 EcoRI, Asp718, BamHI, SalI, HindIII: Restriktionschnittstellen
 Detaillierte Beschreibung der einzelnen Elemente siehe unten.

20 8. Fig 8: Schematische Darstellung der Expressionskassette im Plasmid pΔ0.3TobRB7-cwIso. Bedeutung der Abkürzungen:
 Δ0.3TobRB: Δ0.3TobRB7-Promotor aus *Nicotiana tabacum*
 SP: Signalpeptid des Proteinase-Inhibitor II-Gens
 25 pali: Saccharoseisomerase Gen aus *Erwinia rhamphontici*
 OCS: Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens
 EcoRI, Asp718, BamHI, SalI, HindIII: Restriktionschnittstellen
 Detaillierte Beschreibung der einzelnen Elemente siehe unten.

30 Beispiele

Allgemeine Methoden:

Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, 35 in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeföhrten Klonierungsschritte - wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarosegelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren 40 auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *E. coli* Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA - werden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeföhrt. 45 Die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* wurde entsprechend der Methode von Hofgen und Willmitzer ((1988) Nucl. Acids Res. 16:9877) ausgeführt. Die Anzucht der Agrobakterien erfolgte

in YEB Medium (Vervliet et al. (1975) Gen Virol 26:33). Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgt mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzer der Firma MWG-Licor nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc Natl Acad 5 Sci USA 74:5463-5467).

Beispiel 1: PCR-Amplifikation eines Subfragments der Saccharose-isomerase aus *Erwinia rhabonitici*

10 Die Klonierung eines Subfragments der Saccharoseisomerase erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR). Als Matrizenmaterial diente genomische DNA aus *E. rhabonitici* (DSM 4484), die nach Standardprotokoll isoliert wurde. Die Amplifizierung erfolgte unter Verwendung der nach-
15 folgenden spezifischen Primer, die von einer Saccharoseisomerase-Sequenz des Standes der Technik abgeleitet wurden:

FB83 5'-GGATCCGGTACCGTTCAGCAATCAAAT-3' (SEQ ID NO: 25)

20 FB84 5'-GTCGACGTCTTGCCAAAAACCTT-3' (SEQ ID NO: 26)

Primer FB83 umfaßt die Basen 109 bis 127 und Primer FB84 die Basen 1289 bis 1306 der kodierenden Region des Saccharose-isomerase-Gens von *E. rhabonitici*.

25

Das PCR-Reaktionsgemisch (100 µl) enthielt:

30 - chromosomale Bakterien DNA (1 µg)
- Primer FB 83 und FB 84 (jeweils 250 ng),
- Pfu DNA-Polymerase-Reaktionspuffer (10 µl, Stratagene),
- 200 µM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und
- 2,5 Einheiten Pfu DNA-Polymerase (Stratagene).

35 Vor Beginn der Amplifikationszyklen wurde das Gemisch für 5 min auf 95°C erhitzt. Die Polymerisierungsschritte (30 Zyklen) wurden in einem automatischen T3-Thermocycler (Biometra) nach folgendem Programm durchgeführt: Denaturierung 95°C (1 Minute), Anlagerung der Primer bei 55°C (40 Sekunden), Polymerase-Reaktion bei 72°C (2 Minuten). Das erhaltene Fragment wurde in den Vektor pCR-Blunt 40 (Invitrogen) kloniert. Die Identität der amplifizierten DNA wurde mittels Sequenzanalyse verifiziert.

45 Das amplifizierte Subfragment kann auch als Hybridisierungssonde für die Isolierung weiterer Saccharoseisomerase-DNA-Sequenzen aus anderen Organismen oder als Sonde bei der Analyse transgener Zellen und Pflanzen eingesetzt werden.

Beispiel 2: PCR-Amplifikation einer Saccharoseisomerase aus *Erwinia rhabonitici*

Unter Verwendung des in Beispiel 1 amplifizierten Fragmentes 5 wurde eine genomische Bank von *Erwinia rhabonitici* nach Standardmethoden durchmustert. Anschließende Sequenzanalysen erlaubten die Bestimmung des offenen Leserahmens der Saccharoseisomerase. Von dieser Sequenz wurden die Oligonukleotidprimer FB83 und FB97 abgeleitet.

10

Die Klonierung des vollständigen offenen Leserasters der Saccharose-Isomerase erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR). Als Matrizenmaterial diente 15 genomische DNA aus *E. rhabonitici* (DSM 4484), die nach Standardprotokoll isoliert wurde. Die Amplifikierung erfolgte unter Verwendung der nachfolgenden spezifischen Primer

FB83 5'-GGATCCGGTACCGTTCAGCAATCAAAT-3' (SEQ ID NO: 25)

20 FB97 5'-GTCGACCTACGTGATTAAGTTTATA-3' (SEQ ID NO: 27)

Primer FB83 umfaßt die Basen 109 bis 127 und Primer FB97 die 25 Basen 1786 bis 1803 der kodierenden Region des Saccharose-isomerase-Gens. Zur Klonierung der amplifizierten DNA in Expressionsvektoren tragen die Primer zusätzlich folgende Restriktionschnittstellen: Primer FB 83, BamHI und Primer FB 97, SalI.

Das PCR-Reaktionsgemisch (100 µl) enthielt:

30

- chromosomal Bakterien-DNA (1 µg),
- Primer FB83 und FB97 jeweils 250 ng,
- Pfu DNA-Polymerase-Reaktionspuffer (10 µl Stratagene),
- 200 µM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und
35 - 2,5 Einheiten Pfu DNA-Polymerase (Stratagene).

Vor Beginn der Amplifikationszyklen wurde das Gemisch für 5 min 40 auf 95°C erhitzt. Die Polymerisierungsschritte (30 Zyklen) wurden in einem automatischen T3-Thermocycler (Biometra) nach folgendem Programm durchgeführt: Denaturierung 95°C (1 Minute), Anlagerung der Primer bei 55°C (40 Sekunden), Polymerase-Reaktion bei 72°C (2 Minuten). Das amplifizierte Saccharoseisomerase-Fragment wurde in den Vektor pCR-Blunt (Invitrogen) kloniert, wodurch das Plasmid pCR-SucIso2 (ohne Translationsstart) erhalten wurde. 45 Die Identität der amplifizierten DNA wurde mittels Sequenzanalyse verifiziert. Das PCR-Fragment beinhaltet somit die Sequenz einer

Saccharoseisomerase aus *E. rhabontici*, die sich von Nukleotid 109-1803 des Saccharoseisomerase-Gens erstreckt.

Beispiel 3: Herstellung von Plasmid p35S-cwIso

5

Eine DNA Sequenz, die für eine Saccharose-Isomerase kodiert, wurde aus dem Plasmid pCR-SucIso2 isoliert und mit dem 35S-Promotor des Cauliflower Mosaik Virus, der eine konstitutive Expression in transgenen Pflanzenzellen vermittelt sowie 10 einem pflanzlichen Terminationssignal versehen. Das pflanzliche Terminationssignal beinhaltet das 3'-Ende der Polyadenylierungsstelle des Octopin-Synthase Gens.

Vor die kodierende Sequenz des Saccharoseisomerase-Gens wurde 15 außerdem ein für die Aufnahme in das Endoplasmatische Retikulum notwendiges Signalpeptid eines pflanzlichen Gens (Proteinase-Inhibitor II-Gen aus Kartoffel (Keil et al. (1986) Nucl Acids Res 14:5641-5650; Genbank Acc.-No.: X04118) fusioniert. Dazu wurde das Saccharoseisomerase-Fragment aus dem Konstrukt pCR-SucIso2 20 über die Restriktionsschnittstellen BamHI und SalI herausgeschnitten und in einen BamHI/SalI-geöffneten pMA-Vektor ligiert. Der Vektor pMA stellt eine modifizierte Form des Vektors pBinAR (Höfgen und Willmitzer (1990) Plant Sci. 66:221-230) dar. Welche 25 den 35S-Promotor des Cauliflower Mosaik Virus, der eine konstitutive Expression in transgenen Pflanzen vermittelt, ein Signalpeptid des Proteinase-Inhibitors II aus Kartoffel, welches die Zielsteuerung des Fusionsproteins in die Zellwand vermittelt, sowie ein pflanzliches Terminationssignal enthält. Das pflanzliche Terminationssignal beinhaltet das 3'-Ende der Polyadenylierungs- 30 stelle des Octopin-Synthase Gens. Zwischen der Teilsequenz des Proteinase-Inhibitors und dem Terminationssignal befinden sich Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BamHI, XbaI, SalI, PstI und SphI (in dieser Reihenfolge), welche die Insertion entsprechender DNA-Fragmente ermöglichen, so dass ein Fusionprotein zwischen dem Proteinase-Inhibitor Signalpeptid und dem 35 eingefügten Protein entsteht, welches dann in die Zellwand von transgenen Pflanzenzellen befördert wird, die dieses Protein exprimieren. Die Expressionskassette im Plasmid p35S-cwIso besteht somit aus den Fragmenten A, B und C (Fig. 1):

40

A) Fragment A beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower Mosaik Virus (CaMV). Es enthält ein Fragment, welches die Nukleotide 6909 bis 7437 des CaMV umfaßt (Franck (1980) Cell 21:285).

B) Fragment B enthält die Nukleotide 923 bis 1059 eines Proteinase-Inhibitor II-Gens aus der Kartoffel (Keil et al., supra), welche über einen Linker mit der Sequenz ACC GAA TTG GG an das Saccharoseisomerase Gen aus *Erwinia rhabontici*, 5 welches die Nukleotide 109 bis 1803 umfaßt, fusioniert sind. Dadurch wird ein für die Aufnahme von Proteinen in das Endoplasmatische Retikulum (ER) notwendige Signalpeptid eines pflanzlichen Proteins N-terminal an die Saccharoseisomerase Sequenz fusioniert.

10 C) Fragment C enthält das Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens (Dhaese et al. (1983) EMBO J. 2:419-426. GenBank Acc.-No.: Z37515, Nukleotide 1344 bis 1533).

15 In p35S-cwIso (35S = 35S-Promotor, cw = Zellwand, Iso = Saccharoseisomerase) steht die kodierende Region der Saccharoseisomerase aus *E. rhabontici* unter konstitutiver Kontrolle, das Genprodukt wird in das ER aufgenommen und anschließend sekretiert.

20 Beispiel 4: Herstellung von Plasmid pB33-cwIso

Das Plasmid pB33-cwIso wurde unter Verwendung des binären Plasmids p35S-cwIso hergestellt. Dabei wurde der 35S-Promoter 25 gegen den Promotor des Klasse I Patatin-Gens (Rocha-Sosa et al (1989) EMBO J 8:23-29) ausgetauscht. Die Expressionskassette dieses Plasmids pB33-cwIso besteht somit aus den drei Fragmenten A, B und C (siehe Fig. 2):

30 A) Fragment A beinhaltet die Region -1512 bis +14 relativ zur Transkriptionsinitiationsstelle des Klasse I Patatin-Gens. Die Promotorregion wurde als DraI-Fragment in den mit SstI geschnittenen Vektor pUC18, dessen Enden unter Einsatz der T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und somit geglättet 35 worden waren, ligiert. Anschließend wurde das Fragment mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Asp718 aus dem Vektor pUC18 wieder ausgeschnitten und in das Plasmid p35S-cwIso kloniert, aus dem vorher der 35S CaMV-Promotor nach partieller Restriktion mit den Enzymen EcoRI und 40 Asp718 deletiert worden war.

B) Fragment B enthält die Nukleotide 923 bis 1059 eines Proteinase-Inhibitor II-Gens aus der Kartoffel, welche über einen Linker mit der Sequenz ACC GAA TTG GG an das Saccharoseisomerase-Gen aus *E. rhabontici*, welches die 45 Nukleotide 109 bis 1803 umfasst, fusioniert sind. Dadurch wird ein für die Aufnahme von Proteinen in das ER notwendiges

Signalpeptid eines pflanzlichen Proteins N-terminal an die Saccharoseisomerase-Sequenz fusioniert.

5 C) Fragment C enthält das Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens (Dhaese et al. (1983) EMBO J 2:419-426; GenBank Acc.-No.: Z37515, Nukleotide 1344 bis 1533).

10 In pB33-cwIso (B33 = Promotor des Klasse I Patatin-Gens B33, cw = Zellwand, Iso = Saccharoseisomerase) steht die kodierende Region der Saccharoseisomerase aus *E. rhabontici* unter gewebe-spezifischer Kontrolle, das Genprodukt wird in das ER aufgenommen.

15 Beispiel 5: Kartoffeltransformation und Selektion transgener Pflanzen

20 kleine, mit einem Skalpell verwundete Blätter einer Kartoffel-Sterilkultur (*Solanum tuberosum* L. cv. Solara) wurden in 10 ml MS-Medium mit 2 % Saccharose gelegt, welches 50 µl einer unter 20 Selektion gewachsenen *Agrobacterium tumefaciens*-Übernachtkultur enthielt. Nach 5-minütigem, leichtem Schütteln wurden die Petri-schalen bei 25°C im Dunkeln inkubiert. Nach zwei Tagen wurden die Blätter auf MS-Medium mit 1,6 % Glucose, 2 mg/l Zeatinribose, 0,02 mg/l Giberellinsäure, 500 mg/l Claforan, 50 mg/l Kanamycin 25 und 0,8 % Bacto-Agar ausgelegt. Nach einwöchiger Inkubation bei 25°C und 3000 Lux wurde die Claforankonzentration im Medium halbiert. Eine weitere Woche Kultivierung erfolgte unter bekannten Bedingungen (Rocha-Sosa et al. (1989) EMBO J 8:23-29).

30 Unter Verwendung des pB33-cwIso Plasmids wurden nach Agrobakterien-vermittelter Transformation insgesamt 36 kanamycin-resistente Kartoffelpflanzen regeneriert. Die Knollen dieser Pflanzen wurden mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers gegen das rekombinante PalI Protein (Börnke et al. (2002) 35 Planta 214:356-364) auf palI Expression untersucht. Bei 25 Linien konnte palI Expression im Westernblot nachgewiesen werden. Ein Westernblot von repräsentativen Linien ist in Fig. 3 dargestellt.

40 Beispiel 6: HPLC-Analyse der transgenen pB33-cwIso-Kartoffeln

Mit dem Ziel des Nachweises der *in vivo* Konversion von Saccharose in Palatinose wurden Knollenextrakte der transgenen Linien mittels HPLC hinsichtlich ihres Gehaltes an löslichen Kohlen-45 hydraten untersucht. Die HPLC Analyse wurde nach der in Börnke et al. (2002) Planta 214:356-364 beschrieben Methode durchgeführt. Die Herstellung der Knollen Extrakte ist beschrieben

bei Sonnewald et al. (1992) Plant J 2:571-581. Die Resultate der HPLC Analyse sind in Fig. 4 dargestellt.

Wie die Chromatogramme zeigen, führt die Expression der Saccharoseisomerase in der Zellwand zu einer substantiellen Akkumulation von Palatinose in den Knollen der untersuchten pB33-cwIso-Linien. Der Wildtyp enthält keine Palatinose, wie ebenfalls aus den Chromatogrammen deutlich zu erkennen ist. Der Gehalt an löslichen Zuckern in transgenen Kartoffelknollen, die das Konstrukt pB33-cwIso enthalten, ist in Fig. 5 dargestellt. Der Gehalt an Palatinose in den Kartoffelknollen variiert zwischen den einzelnen transgenen Linien zwischen 1,7 µmol/g FW (FW: "fresh weight" = Frischgewicht) (Linie 14) und 16 µmol/g FW (Linie 5).

15

Beispiel 7: Infektion von Kartoffelscheiben mit *Alternaria solani*

Alternaria solani (bereitgestellt von Dr. Jürgen Sigrist, Zentrum für Grüne Gentechnik, Neustadt an der Weinstraße) wurden auf PDA-Agar (Duchefa, Niederlande) für 14 Tage bei 16°C gehalten (PDA = Potato Dextrose Agar). Die Sporen wurden durch Abschaben in Wasser isoliert und die erhaltene Suspension durch Miracloth von festen Bestandteilen befreit. Die Sporeanzahl wurde in einer Zählkammer (Thoma) bestimmt und auf 10000 Sporen/ml eingestellt. 25 25 µl (demnach 250 Sporen) wurden pro Kartoffelscheibe (1,5 cm Durchmesser) aufgetragen und gleichmäßig verteilt. Die inokulierten Scheiben wurden anschließend bei 16°C inkubiert. Die Bonitur erfolgte optisch. Das Ergebnis nach 14-tägiger Inkubation ist in Fig. 6 dargestellt. Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, ist 30 das Wachstum des Pilzes auf transgenen Kartoffelknollen, die die Saccharoseisomerase exprimieren im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert.

35

Beispiel 8: Herstellung des Plasmids pLemmi9-cwIso Zur Herstellung des Plasmids pLemmi9-cwIso wurde der Promotor des Klasse I Patatin-Gens B33 im Plasmid pB33-cwIso gegen den Lemmi9 Promotor Escobar et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:440-449) ausgetauscht und das Fusionsprotein aus Proteinase-Inhibitor II-Signalpeptid und der Saccharoseisomerase somit unter die Kontrolle des "Feeding cell"-spezifischen Promotor gestellt.

40 Die Funktionalität des "Feeding cell"-spezifischen Lemmi9-Promotors wurde bereits demonstriert (Escobar C et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:440-449). Das Plasmid pLemmi9-cwIso beinhaltet drei Fragmente A, B und C (siehe Fig. 7):

A) Fragment A beinhaltet den Lemmi9-Promotor aus Tomate (Lycopersicon esculentum). Das Fragment beinhaltet die Sequenz von 1417 bp vor dem Translationsstart (ATG) des Lemmi9-Gens und wurde als funktionelles Promoterfragment charakterisiert (Escobar et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12: 440-449, Accession Z69032). Es wurde mittels PCR aus genomicscher DNA von Tomate (Lycopersicon esculentum) amplifiziert. Die Amplifizierung erfolgte unter Verwendung der folgenden spezifischen Primer:

10 Lem1: 5' atcGAATTCTATAATTAACCATCTAGAG 3' (SEQ ID NO: 28)

Lem2: 5' atcGGTACCTGCTTCTGGAACGAAAGGG 3' (SEQ ID NO: 29)

15 Zur Klonierung der DNA in die Expressionskassette tragen die Primer zusätzlich folgende Restriktionsschnittstellen: Primer Lem1, EcoRI; Primer Lem2, Asp718.

20 Das PCR-Reaktionsgemisch (100 µl) enthielt:

25 - genomische Tomaten-DNA (1 µg),
- Primer Lem1 und Lem2 (jeweils 250 ng),
- Pfu DNA-Polymerase-Reaktionspuffer (10 µl, Stratagene),
- 200 µM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und
- 2,5 Einheiten Pfu DNA-Polymerase (Stratagene).

30 Vor Beginn der Amplifikationszyklen wurde das Gemisch für 5 min auf 95°C erhitzt. Die Polymerisierungsschritte (30 Zyklen) wurden in einem automatischen T3-Thermocycler (Biometra) nach folgendem Programm durchgeführt: Denaturierung 95°C (1 Minute), Anlagerung der Primer bei 56°C (40 Sekunden), Polymerase-Reaktion bei 72°C (3 Minuten). Das Amplikon wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Asp718 verdaut und in die entsprechenden Restriktions-35 schnittstellen des Polylinkers von pBluescript (Stratagene) kloniert. Die Identität der amplifizierten DNA wurde mittels Sequenzanalyse verifiziert. Anschließend wurde das Fragment mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Asp718 verdaut und in das Plasmid pB33-cwIso kloniert aus dem vorher der B33-Promotor nach partieller Restriktion mit den Enzymen EcoRI und Asp718 deletiert wurde.

40 B) Fragment B enthält die Nukleotide 923 bis 1059 des Proteinase-Inhibitor II-Gens aus der Kartoffel (Keil et al. (1986) Nucl Acids Res 14:5641-5650; Genbank Acc.No.: X04118), welche über einen Linker mit der Sequenz ACC GAA TTG GG an das Saccharoseisomerase-Gen aus E. rhabontici, welches die

Nukleotide 109 bis 1803 umfasst, fusioniert sind. Dadurch ist ein für die Aufnahme von Proteinen in das ER notwendiges Signalpeptid eines pflanzlichen Proteins N-terminal an die Saccharoseisomerase-Sequenz fusioniert.

5

C) Fragment C enthält das Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens (Dhaese et al. (1983) EMBO J 2:419-426. Accession Z37515, Nukleotide 1344 bis 1533).

10 In pLemmi9-cwIso (Lemmi9 = Promotor des Lemmi9-Gens aus Tomate (*Lycopersicon esculentum*), cw = Zellwand, Iso = Saccharose-isomerase) steht die kodierende Region des Saccharoseisomerase-Gens unter Feeding cell-spezifischer Kontrolle, das Genprodukt wird in das ER aufgenommen.

15

Analog wurde ein Kontrollkonstrukt zur Expression von β -Glucuronidase (Jefferson et al. (1987) EMBO J 6:3901-3907) unter Kontrolle des Lemmi9-Promotors hergestellt (pLemmi9-GUS).

20 Kartoffelzellen wurden wie oben beschrieben mittels Agrobacterium-vermitteltem Gentransfer mit dem Konstrukt pLemmi9-cwIso bzw. pLemmi9-GUS transformiert und ganze Kartoffelpflanzen wurden regeneriert.

25 Beispiel 9: Herstellung des Plasmids p Δ 0.3TobRB7-cwIso

Zur Herstellung des Plasmids p Δ 0.3TobRB7-cwIso wurde der Promotor des Klasse I Patatin-Gens B33 im Plasmid pB33-cwIso gegen den Δ 0.3TobRB7 Promotor (Opperman et al. (1994) Science 263:221-223) ausgetauscht und das Fusionsprotein aus Proteinase-Inhibitor-Signalpeptid und der Saccharoseisomerase somit unter Feeding cell-spezifische Kontrolle gestellt.

Die Funktionalität des "Feeding cell"-spezifischen Δ 0.3TobRB7-

35 Promotors wurde bereits demonstriert (Opperman et al. (1994) Science 263:221-223). Das pflanzliche Terminationssignal beinhaltet das 3'-Ende der Polyadenylierungsstelle des Octopin-Synthase-Gens. Das Plasmid p Δ 0.3TobRB7-cwIso beinhaltet drei Fragmente A, B und C (Fig. 8):

40

A) Fragment A beinhaltet den Δ 0.3TobRB7-Promotor aus *Nicotiana tabacum*. Das Fragment beinhaltet die Region von -298 bp bis +76 des TobBR7-Gens befinden und als funktionelles Promotorfragment charakterisiert wurden (Opperman et al. (1994) Science. 263: 221-223, Acc.-No.: S45406). Es wurde mittels PCR aus genomischer DNA von *Nicotiana tabacum* Var. Samsun NN

amplifiziert. Die Amplifizierung erfolgte unter Verwendung der folgenden spezifischen Primer:

Tob1: 5'-GGAATTCAGCTTATCTAACAAAGTTTAAATTC-3' (SEQ ID NO: 30)

5

Tob2: 5'-GGGTACCCAGTTCTCACTAGAAAAATGCC-3' (SEQ ID NO: 31)

Zur Klonierung der DNA in die Expressionskassette tragen die 10 Primer zusätzlich folgende Restriktionsschnittstellen: Primer Tob1, EcoRI; Primer Tob2, Asp718.

Das PCR-Reaktionsgemisch (100 µl) enthielt:

15

- genomische DNA aus Tabak (1 µg),
- Primer Tob1 und Tob2 (jeweils 250 ng),
- Pfu DNA-Polymerase-Reaktionspuffer (10 µl, Stratagene),
- 200 µM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und
- 2,5 Einheiten Pfu DNA-Polymerase (Stratagene).

20 Vor Beginn der Amplifikationszyklen wurde das Gemisch für 5 min auf 95°C erhitzt. Die Polymerisierungsschritte (30 Zyklen) wurden in einem automatischen T3-Thermocycler (Biometra) nach folgendem Programm durchgeführt: Denaturierung 95°C (1 Minute), Anlagerung der Primer bei 25 56°C (40 Sekunden), Polymerase-Reaktion bei 72°C (3 Minuten). Das Amplikon wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Asp718 verdaut und in die entsprechenden Restriktions-30 schnittstellen des Polylinkers von pBluescript (Stratagene) kloniert. Die Identität der amplifizierten DNA wurde mittels Sequenzanalyse verifiziert. Anschließend wurde das Fragment mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Asp718 verdaut und in das Plasmid pB33-cwIso kloniert aus dem vorher der B33-Promotor nach Restriktion mit den Enzymen EcoRI und Asp718 deletiert wurde.

35

B) Fragment B enthält die Nukleotide 923 bis 1059 eines Proteinase-Inhibitor II-Gens aus der Kartoffel (Keil et al. (1986) Nucl. Acids Res. 14:5641-5650; Genbank Acc.No.: X04118), welche an das Saccharoseisomerase-Gen aus *E. rhapontici*, welches die Nukleotide 109 bis 1803 umfasst, fusioniert sind. Dadurch wird ein für die Aufnahme von Proteinen in das ER notwendiges Signalpeptid eines pflanzlichen Proteins N-terminal an die Saccharoseisomerase-Sequenz fusioniert.

C) Fragment C enthält das Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens (Dhaese et al. (1983) EMBO J 2:419-426. Accession Z37515, Nukleotide 1344 bis 1533).

5 In pΔ0.3TobRB7-cwIso (Δ0.3TobRB7 = verkürzter Promotor des TobRB7-Gens aus Tabak, cw = Zellwand, Iso = Saccharoseisomerase) steht die kodierende Region des Saccharoseisomerase-Gens unter "Feeding cell"-spezifischer Kontrolle, das Genprodukt wird in das ER aufgenommen.

10

Analog wurde ein Kontrollkonstrukt zur Expression von β -Glucuronidase (Jefferson et al. (1987) EMBO J 6:3901-3907) unter Kontrolle des Δ0.3TobRB7-Promotors hergestellt (pΔ0.3TobRB7-GUS).

15 Kartoffelzellen wurden wie oben beschrieben mittels Agrobacterium-vermitteltem Gentransfer mit dem Konstrukt pΔ0.3TobRB7-cwIso bzw. pΔ0.3TobRB7-GUS transformiert und Kartoffelpflanzen wurden regeneriert

20 Beispiel 10: Infektion der Pflanzen mit Nematoden

Transformierte Pflanzen werden mit Hilfe von npt-spezifischen Primern über PCR bestätigt. Zur Infektion mit Nematoden werden die Stecklinge von transgenen Linien, die die Saccharoseisomerase

25 unter Kontrolle eines „Feeding cell“-spezifischen Promotors exprimieren, zuerst auf Medium mit Kanamycin angezogen und später in Töpfe mit steriler Erde transferiert. Die Pflanzen werden bei 22°C (16 h Tag/8 h Nacht) angezogen. Die Infektion der Pflanzen wird wie folgt durchgeführt: 3 ml einer Suspension

30 (ca. 500 J2-Larven) von Wurzelgallennematoden (Meloidogyne-Arten) werden direkt neben den Stengeln der Pflanzen in die Erde inokuliert. Die Pflanzen werden nach 2 bis 3 Wochen aus den Töpfen entfernt und die Wurzeln gewaschen. Anschließend wird die gesamte Wurzel einer jeden Pflanze mit Hilfe eines Stereo-35 mikroskopes untersucht und die Anzahl der Gallen am Wurzelsystem von transgenen Pflanzen und Wildtyppflanzen verglichen.

Transgene Pflanzen, die die Saccharoseisomerase unter Kontrolle eines „Feeding cell“-spezifischen Promotors exprimieren, zeigen 40 eine deutliche Resistenz gegenüber endoparasitären Wurzel-nematoden. Die Anzahl der Gallen am Wurzelsystem dieser Pflanzen nach Nematodenbefall ist im Vergleich zu nicht-transformierten Pflanzen signifikant reduziert.

45 Beispiel 11: In vitro Nematodenresistenz-Test

Materialien:

Pflanzen: Kartoffel (*Solanum tuberosum* L. cv. *Solara*)

Nematoden: *Meloidogyne incognita*

Medium: modifiziertes Murashige & Skoog Medium (MSm; verfestigt

5 mit Agar) bestehend aus micro und 1/2 macro-Elementen einschließlich Vitaminen, Sucrose und Diachin-Agar (0,7%) pH 5,8.

10 Pflanzen: Sterile transgene Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum* L. cv. *Solara* transformiert mit *pΔ0.3TobRB7-cwIso* bzw. *pLemmi9-cwIso*) und entsprechende transgene Kontrollpflanzen (*Solanum tuberosum* L. cv. *Solara* transformiert mit *pΔ0.3TobRB7-GUS* bzw. *pLemmi9-GUS*) wurden in Gläsern mit jeweils mehreren Pflanzen 15 bereitgestellt. Ausgehend von jeder Pflanze wurden jeweils drei Linien mittels Stengelabschnitten und nachfolgender Kultivierung auf modifiziertem Murashige & Skoog Medium (MSm; verfestigt mit Agar) generiert. Jede Linie wurde auf einer separaten 9 cm Petrischale ausgepflanzt. Die Pflanzen wurden für 2 bis 3 Wochen unter 20 einem Licht/Dunkel-Regim von 16h Licht / 8h Dunkelheit bei 25°C gezüchtet.

Nematoden-Stammkultur:

Nematoden wurden aus sterilen Stammkulturen gewonnen. *M. incognita* wurde monoxenisch in der Dunkelheit bei 25°C auf Wurzelexplantaten von *Cucumis sativus* gezüchtet, wie bei Wyss et al. beschrieben (Wyss U et al. (1992) *Nematologica* 38:98-111). Eiersäcke wurden aus den Sterilkulturen gesammelt und auf einem Sieb in einem Glastrichter mit steriles Wasser plaziert. Die Trichter 30 wurden mit einem Plastikschlauch verbunden, welcher mit einer Klemme verschlossen wurde. Geschlüpfte Jungtiere wurden durch Öffnen der Klemme und Ablassen der Suspension in kleine Gefäße gewonnen. Die Viskosität der Suspension wurde durch Zufügen einer Suspension von steriles "Gel Rite" erhöht. Die Dichte der Nematoden in der Suspension wurde bestimmt und durch Zugabe von steriles Wasser normiert.

Nematodeninfektion

Sobald die Pflanzenwurzeln ein Wurzelsystem entwickelt hatten, 40 wurden die Wurzeln mit frisch geschlüpften Jungnematoden im zweiten Stadium (J2) infiziert. Zehn Tropfen mit jeweils 10 Jungtieren wurden dabei auf jede Pflanze appliziert.

Auswertung:

45 Nach 2 bis 3 Wochen hatten die Nematoden die Wurzeln penetriert und in den Kontrollpflanzen hatten sich Gallen gebildet. Gallenbildung wurde als Zeichen einer erfolgreichen Penetration und

61

Etablierung von Freßstellen in den Wurzeln herangezogen. Die Wurzeln der verschiedenen Pflanzenlinien wurden auf Gallen mikroskopisch untersucht und die Gallen auf der Petrischale vermerkt.

5 Im Vergleich zu den Kontrollpflanzen zeigen die mit pΔ0.3TobRB7-cwIso bzw. pLemmi9-cwIso transformierten Kartoffellinien eine signifikante Verringerung der Gallenbildung. Dies bedeutet eine signifikante Minderung der Nematoden-bedingten Schädigung.

10

15

20

25

30

35

40

45

Patentansprüche

1. Verfahren zum Erzielen oder Erhöhen der Resistenz gegen
5 mindestens ein Pathogen in pflanzlichen Organismen, wobei
nachfolgende Arbeitsschritte umfasst sind
 - a) transgene Expression eines Proteins mit Saccharoseisomerase Aktivität in einem pflanzlichen Organismus oder
10 einem Gewebe, Organ, Teil oder Zelle desselben, und
 - b) Auswahl der pflanzlichen Organismen, bei denen
- im Unterschied oder Vergleich zum Ausgangsorganismus -
15 die Resistenz gegen mindestens ein Pathogen besteht
oder erhöht ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Saccharose-Isomerase
beschrieben wird durch
20 i) ein Protein gemäß SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18
oder 36, oder
ii) ein funktionelles Äquivalent zu einem Protein gemäß
SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 oder 36, oder
25 iii) ein funktionell äquivalentes Fragment zu einem Protein
gemäß i) und ii).
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei die
30 Expression der Saccharoseisomerase gewährleistet wird durch
eine transgene Expressionskassette umfassend mindestens eine
Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
 - a) Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Aminosäuresequenz
35 gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22
oder 36, und
 - b) Nukleinsäuresequenzen kodierend für Proteine mit einer
40 Homologie von mindestens 40% zu der Sequenz gemäß
SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 oder 26
aufweisen, und
 - c) Nukleinsäuresequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11,
45 13, 15, 17, 19, 21 oder 35, und

- d) Nukleinsäuresequenzen, die zu einer Nukleinsäuresequenz von c) degeneriert ist, und
- 5 e) Nukleinsäuresequenzen, die eine Homologie von mindestens 40% zu einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 oder 35 aufweisen, und
- 10 f) Nukleinsäuresequenzen, die mit einem komplementären Strang der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 oder 35 hybridisieren.
- 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Saccharose-Isomerase unter Kontrolle eines in Pflanzen funktionellen pathogen-induzierbaren oder gewebespezifischen Promotors exprimiert wird.
- 15 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Pathogen ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Pilzen und Nematoden.
- 20 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Pathogen ausgewählt ist aus der Gruppe der Pilze bestehend aus Plasmodiophoromycota, Oomycota, Ascomycota, Chytridiomyceten, Zygomyceten, Basidiomycota und Deuteromyceten.
- 25 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Pflanze ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Kartoffel, Rübe, Zuckerrübe, Tomate, Banane, Karotte, Zuckerrohr, Erdbeere, Ananas, Papaya, Soja, Hafer, Gerste, Weizen, Roggen, Triticale, Hirse und Mais.
- 30 8. Transgene Expressionskassette enthalten in funktioneller Verknüpfung mit einem in Pflanzen funktionellen pathogen-induzierbaren oder epidermis-spezifischen Promotor eine Nukleinsäuresequenz kodieren für eine Saccharose-Isomerase.
- 35 9. Transgene Expressionskassette nach Anspruch 8, wobei die Saccharoseisomerase wie in einem der Ansprüche 2 oder 3 definiert ist.
- 40 10. Transgene Expressionskassette nach Anspruch 8 oder 9, wobei der pathogen-induzierbare oder epidermis-spezifische Promotor ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 23, 24, 32, 33 oder 34.

11. Transgener Expressionsvektor enthaltend eine transgene Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10.
12. Transgener Organismus enthaltend eine transgene Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10 oder einen transgenen Expressionsvektor gemäß Anspruch 11.
13. Transgener Organismus nach Anspruch 12, ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzen bestehend aus Kartoffel, Rübe, Zucker-
10 rübe, Tomate, Banane, Karotte, Zuckerrohr, Erdbeere, Ananas, Papaya, Soja, Hafer, Gerste, Weizen, Roggen, Triticale, Hirse und Mais.
14. Transgene Ernteprodukte, Vermehrungsmaterial, Zellen, Organe, Teile, Kalli, Zellkulturen, Samen, Knollen, Stecklinge oder transgene Nachkommen eines transgenen Organismus gemäß einem der Ansprüche 12 bis 13.
15. Verwendung eines transgenen Organismus nach einem der Ansprüche 12 bis 13 oder von diesem angeleitete transgene Ernteprodukte, Vermehrungsmaterial, Zellen, Organe, Teile, Kalli, Zellkulturen, Samen, Knollen, Stecklinge oder transgene Nachkommen nach Anspruch 14 zur Herstellung von Palatinose.

25

30

35

40

45

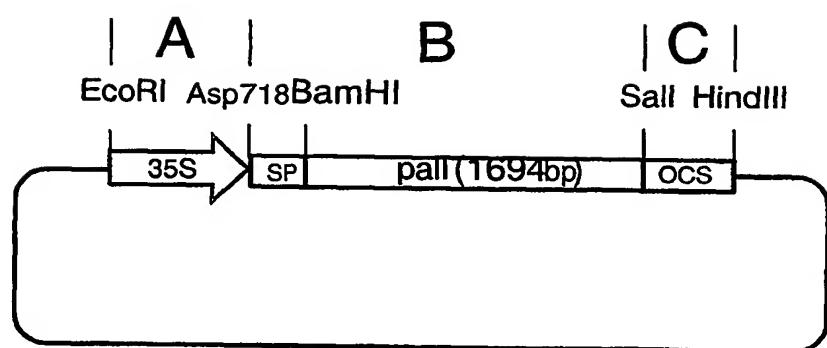


Fig.1

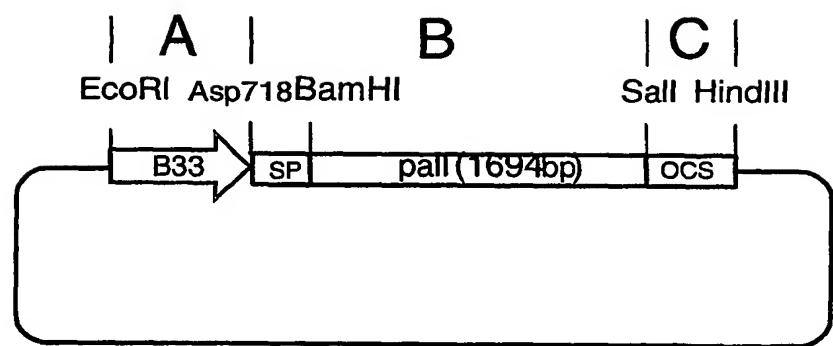


Fig.2

3 / 8

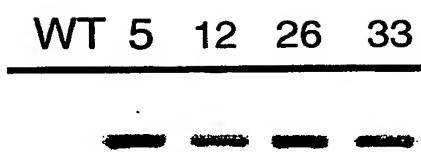


Fig.3

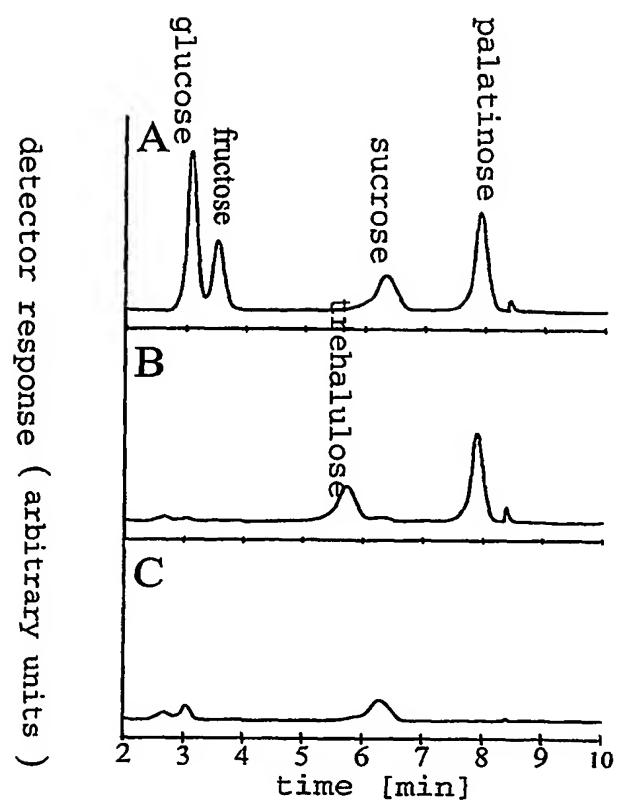


Fig. 4

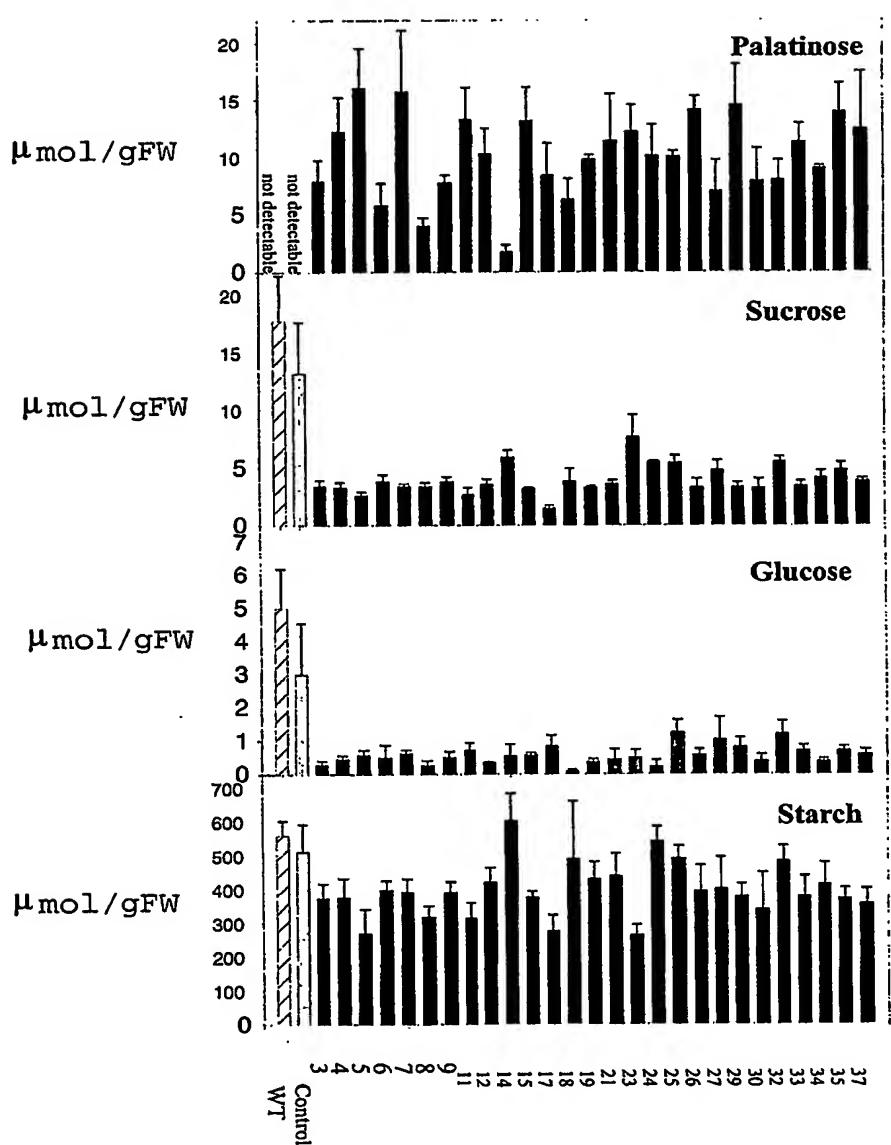


Fig. 5

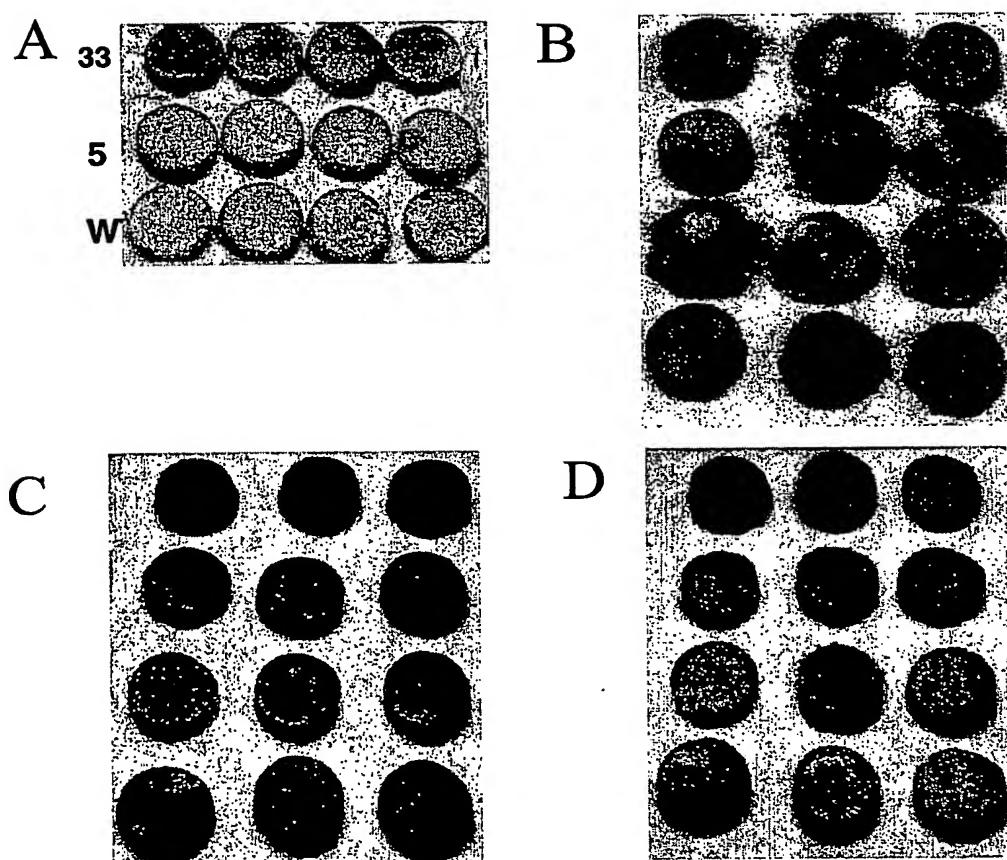


Fig. 6

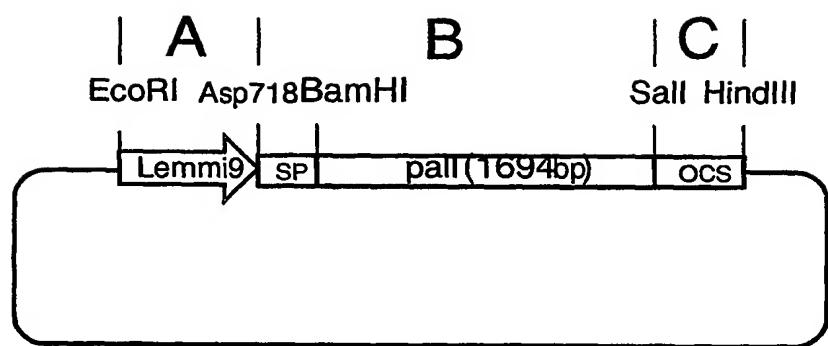


Fig.7

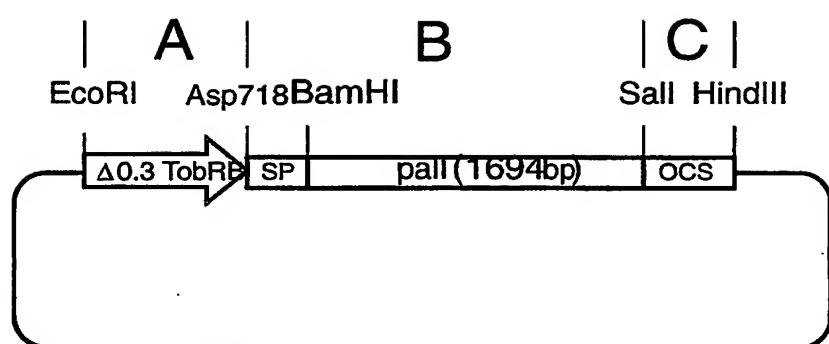


Fig.8

SEQUENZPROTOKOLL

cag	gct	cct	aat	aat	tac	cct	tca	ttc	ttt	ggc	tcg	gct	tgg	caa	576
Gln	Ala	Pro	Asn	Asn	Tyr	Pro	Ser	Phe	Phe	Gly	Gly	Ser	Ala	Trp	Gln
180								185					190		
aaa	gat	gaa	aag	acc	aat	caa	tac	tac	ctg	cac	tat	ttt	gct	aaa	caa
Lys	Asp	Glu	Lys	Thr	Asn	Gln	Tyr	Tyr	Leu	His	Tyr	Phe	Ala	Lys	Gln
195							200				205				
cag	cct	gac	cta	aac	tgg	gat	aat	ccc	aaa	gtc	cgt	caa	gat	ctt	tat
Gln	Pro	Asp	Leu	Asn	Trp	Asp	Asn	Pro	Lys	Val	Arg	Gln	Asp	Leu	Tyr
210						215				220					
gca	atg	tta	cgt	ttc	tgg	tta	gat	aaa	ggc	gtg	tct	ggt	tta	cgt	ttt
Ala	Met	Leu	Arg	Phe	Trp	Leu	Asp	Lys	Gly	Val	Ser	Gly	Leu	Arg	Phe
225						230			235			240			
gat	acg	gta	gct	acc	tac	tca	aaa	att	ccg	gat	ttc	cca	aat	ctc	acc
Asp	Thr	Val	Ala	Thr	Tyr	Ser	Lys	Ile	Pro	Asp	Phe	Pro	Asn	Leu	Thr
245						250			255						
caa	caa	cag	ctg	aag	aat	ttt	gca	gct	gag	tat	acc	aag	ggc	cct	aat
Gln	Gln	Gln	Leu	Lys	Asn	Phe	Ala	Ala	Glu	Tyr	Thr	Lys	Gly	Pro	Asn
260						265			270						
att	cat	cgt	tac	gtc	aat	gaa	atg	aat	aaa	gag	gtc	ttg	tct	cat	tac
Ile	His	Arg	Tyr	Val	Asn	Glu	Met	Asn	Lys	Glu	Val	Leu	Ser	His	Tyr
275						280			285						
gac	att	gct	act	gcc	ggt	gaa	atc	ttt	ggc	gta	ccc	ttg	gat	caa	tct
Asp	Ile	Ala	Thr	Ala	Gly	Glu	Ile	Phe	Gly	Val	Pro	Leu	Asp	Gln	Ser
290						295			300						
ata	aag	ttc	ttc	gat	cgc	cgc	cgt	gat	gag	ctg	aac	att	gca	ttt	acc
Ile	Lys	Phe	Phe	Asp	Arg	Arg	Arg	Asp	Glu	Leu	Asn	Ile	Ala	Phe	Thr
305						310			315			320			
ttt	gac	tta	atc	aga	ctc	gat	cga	gac	tct	gat	caa	aga	tgg	cgt	cga
Phe	Asp	Leu	Ile	Arg	Leu	Asp	Arg	Asp	Ser	Asp	Gln	Arg	Trp	Arg	Arg
325						330			335						
aaa	gat	tgg	aaa	ttg	tcg	caa	ttc	cg	cag	atc	atc	gat	aac	gtt	gac
Lys	Asp	Trp	Lys	Leu	Ser	Gln	Phe	Arg	Gln	Ile	Ile	Asp	Asn	Val	Asp
340						345			350						
cgt	act	gca	gga	gaa	tat	ggt	tgg	aat	gcc	ttc	ttc	ttg	gat	aac	cac
Arg	Thr	Ala	Gly	Glu	Tyr	Gly	Trp	Asn	Ala	Phe	Phe	Leu	Asp	Asn	His
355						360			365						
gac	aat	ccg	cg	gct	gtc	tcg	cac	ttt	ggc	gat	gat	gat	cgc	cca	caa
Asp	Asn	Pro	Arg	Ala	Val	Ser	His	Phe	Gly	Asp	Asp	Asp	Arg	Pro	Gln
370						375			380						
tgg	cgt	gag	cca	tcg	gct	aaa	gct	ttt	gca	acc	ttg	acg	ctg	act	caa
Trp	Arg	Glu	Pro	Ser	Ala	Lys	Ala	Leu	Ala	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Gln
385						390			395			400			
cga	gca	aca	cct	ttt	att	tat	caa	ggt	tca	gaa	ttg	ggc	atg	acc	aat
Arg	Ala	Thr	Pro	Phe	Ile	Tyr	Gln	Gly	Ser	Glu	Leu	Gly	Met	Thr	Asn
405						410			415						
tac	ccg	ttt	aaa	gct	att	gat	gaa	ttc	gat	gat	att	gag	gtg	aaa	ggt
Tyr	Pro	Phe	Lys	Ala	Ile	Asp	Glu	Phe	Asp	Asp	Ile	Glu	Val	Lys	Gly
420						425			430						
ttt	tgg	cat	gac	tac	gtt	gag	aca	gga	aag	gtc	aaa	gcc	gac	gag	ttc
Phe	Trp	His	Asp	Tyr	Val	Glu	Thr	Gly	Lys	Val	Lys	Ala	Asp	Glu	Phe
435						440			445						

ttg caa aat gta cgc ctg acg agc agg gat aac agc cgg acg ccg ttc	450	455	460	1392
Leu Gln Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe				
caa tgg gat ggg agc aaa aat gca gga ttc acg agc gga aaa cct tgg	465	470	475	1440
Gln Trp Asp Gly Ser Lys Asn Ala Gly Phe Thr Ser Gly Lys Pro Trp				
ttc aag gtc aac cca aac tac cag gaa atc aat gca gta agt caa gtc	485	490	495	1488
Phe Lys Val Asn Pro Asn Tyr Gln Glu Ile Asn Ala Val Ser Gln Val				
aca caa ccc gac tca gta ttt aac tat tat cgt cag ttg atc aag ata	500	505	510	1536
Thr Gln Pro Asp Ser Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Gln Leu Ile Lys Ile				
agg cat gac atc ccg gca ctg acc tat ggt aca tac acc gat ttg gat	515	520	525	1584
Arg His Asp Ile Pro Ala Leu Thr Tyr Gly Thr Tyr Thr Asp Leu Asp				
cct gca aat gat tcg gtc tac gcc tat aca cgc agc ctt ggg gcg gaa	530	535	540	1632
Pro Ala Asn Asp Ser Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Ser Leu Gly Ala Glu				
aaa tat ctt gtt gtt aac ttc aag gag caa atg atg aga tat aaa	545	550	555	1680
Lys Tyr Leu Val Val Asn Phe Lys Glu Gln Met Met Arg Tyr Lys				
tta ccg gat aat tta tcc att gag aaa gtg att ata gac agc aac agc	565	570	575	1728
Leu Pro Asp Asn Leu Ser Ile Glu Lys Val Ile Ile Asp Ser Asn Ser				
aaa aac gtg gtg aaa aag aat gat tca tta ctc gag cta aaa cca tgg	580	585	590	1776
Lys Asn Val Val Lys Lys Asn Asp Ser Leu Leu Glu Leu Lys Pro Trp				
cag tca ggg gtt tat aaa act aaa tca ata aat ctc ata gtc acg cca	595	600	605	1824
Gln Ser Gly Val Tyr Lys Thr Lys Ser Ile Asn Leu Ile Val Thr Pro				
aat aat gta aat ata ttg aaa cta tta aaa ccg gca ttt tat gcc ggt	610	615	620	1872
Asn Asn Val Asn Ile Leu Lys Leu Leu Lys Pro Ala Phe Tyr Ala Gly				
ttt ttt agc gca aaa tag	625			1890
Phe Phe Ser Ala Lys				
<210> 2				
<211> 629				
<212> PRT				
<213> <i>Protaminobacter rubrum</i>				
<400> 2				
Met Pro Arg Gln Gly Leu Lys Thr Ala Leu Ala Ile Phe Leu Thr Thr	1	5	10	15
Ser Leu Cys Ile Ser Cys Gln Gln Ala Phe Gly Thr Gln Gln Pro Leu	20	25	30	
Leu Asn Glu Lys Ser Ile Glu Gln Ser Lys Thr Ile Pro Lys Trp Trp	35	40	45	
Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr	50	55	60	
Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Ile Asn Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp	65	70	75	80

Tyr Leu Lys Ala Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr
 85 90 95
 Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys
 100 105 110
 Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser
 115 120 125
 Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn
 130 135 140
 His Thr Ser Asp Gln Asn Glu Trp Phe Val Lys Ser Lys Ser Ser Lys
 145 150 155 160
 Asp Asn Pro Tyr Arg Gly Tyr Tyr Phe Trp Lys Asp Ala Lys Glu Gly
 165 170 175
 Gln Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln
 180 185 190
 Lys Asp Glu Lys Thr Asn Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln
 195 200 205
 Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr
 210 215 220
 Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe
 225 230 235 240
 Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asp Phe Pro Asn Leu Thr
 245 250 255
 Gln Gln Gln Leu Lys Asn Phe Ala Ala Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Asn
 260 265 270
 Ile His Arg Tyr Val Asn Glu Met Asn Lys Glu Val Leu Ser His Tyr
 275 280 285
 Asp Ile Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Gln Ser
 290 295 300
 Ile Lys Phe Phe Asp Arg Arg Arg Asp Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr
 305 310 315 320
 Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ser Asp Gln Arg Trp Arg Arg
 325 330 335
 Lys Asp Trp Lys Leu Ser Gln Phe Arg Gln Ile Ile Asp Asn Val Asp
 340 345 350
 Arg Thr Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His
 355 360 365
 Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Asp Arg Pro Gln
 370 375 380
 Trp Arg Glu Pro Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln
 385 390 395 400
 Arg Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn
 405 410 415
 Tyr Pro Phe Lys Ala Ile Asp Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly
 420 425 430
 Phe Trp His Asp Tyr Val Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala Asp Glu Phe
 435 440 445
 Leu Gln Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe
 450 455 460

Gln Trp Asp Gly Ser Lys Asn Ala Gly Phe Thr Ser Gly Lys Pro Trp
 465 470 475 480
 Phe Lys Val Asn Pro Asn Tyr Gln Glu Ile Asn Ala Val Ser Gln Val
 485 490 495
 Thr Gln Pro Asp Ser Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Gln Leu Ile Lys Ile
 500 505 510
 Arg His Asp Ile Pro Ala Leu Thr Tyr Gly Thr Tyr Asp Leu Asp
 515 520 525
 Pro Ala Asn Asp Ser Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Ser Leu Gly Ala Glu
 530 535 540
 Lys Tyr Leu Val Val Val Asn Phe Lys Glu Gln Met Met Arg Tyr Lys
 545 550 555 560
 Leu Pro Asp Asn Leu Ser Ile Glu Lys Val Ile Ile Asp Ser Asn Ser
 565 570 575
 Lys Asn Val Val Lys Lys Asn Asp Ser Leu Leu Glu Leu Lys Pro Trp
 580 585 590
 Gln Ser Gly Val Tyr Lys Thr Lys Ser Ile Asn Leu Ile Val Thr Pro
 595 600 605
 Asn Asn Val Asn Ile Leu Lys Leu Leu Lys Pro Ala Phe Tyr Ala Gly
 610 615 620
 Phe Phe Ser Ala Lys
 625

<210> 3
 <211> 1305
 <212> DNA
 <213> *Erwinia rhabontici*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1305)
 <223> coding for N-terminal fragment of sucrose
 isomerase

<400> 3
 atg tcc tct caa gga ttg aaa acg gct ntc gct att ttt ctt gca acc 48
 Met Ser Ser Gln Gly Leu Lys Thr Ala Xaa Ala Ile Phe Leu Ala Thr
 1 5 10 15
 act ttt tct gcc aca tcc tat cag gcc tgc agt gcc nnn cca gat acc 96
 Thr Phe Ser Ala Thr Ser Tyr Gln Ala Cys Ser Ala Xaa Pro Asp Thr
 20 25 30
 gcc ccc tca ctc acc gtt cag caa tca aat gcc ctg ccc aca tgg tgg 144
 Ala Pro Ser Leu Thr Val Gln Gln Ser Asn Ala Leu Pro Thr Trp Trp
 35 40 45
 aag cag gct gtt ttt tat cag gta tat cca cgc tca ttt aaa gat acg 192
 Lys Gln Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr
 50 55 60
 aat ggg gat ggc att ggg gat tta aac ggt att att gag aat tta gac 240
 Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Leu Asn Gly Ile Ile Glu Asn Leu Asp
 65 70 75 80
 tat ctg aag aaa ctg ggt att gat gcg att tgg atc aat cca cat tac 288
 Tyr Leu Lys Lys Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr
 85 90 95

gat tcg ccg aat acg gat aat ggt tat gac atc cg ^g gat tac cgt aag	336
Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys	
100 105 110	
ata atg aaa gaa tac ggt acg atg gaa gac ttt gac cgt ctt att tca	384
Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser	
115 120 125	
gaa atg aag aaa cgc aat atg cgt ttg atg att gat att gtt atc aac	432
Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Ile Val Ile Asn	
130 135 140	
cac acc agc gat cag cat gcc tgg ttt gtt cag agc aaa tcg ggt aag	480
His Thr Ser Asp Gln His Ala Trp Phe Val Gln Ser Lys Ser Gly Lys	
145 150 155 160	
aac aac ccc tac agg gac tat tac ttc tgg cgt gac ggt aag gat ggc	528
Asn Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Gly	
165 170 175	
cat gcc ccc aat aac tat ccc tcc ttc ttc ggt ggc tca gcc tgg gaa	576
His Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Glu	
180 185 190	
aaa gac gat aaa tca ggc cag tat tac ctc cat tac ttt gcc aaa cag	624
Lys Asp Asp Lys Ser Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln	
195 200 205	
caa ccc gac ctc aac tgg gac aat ccc aaa gtc cgt caa gac ctg tat	672
Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr	
210 215 220	
gac atg ctc cgc ttc tgg tta gat aaa ggc gtt tct ggt tta cgc ttt	720
Asp Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe	
225 230 235 240	
gat acc gtt gcc acc tac tcg aaa atc ccg aac ttc cct gac ctt agc	768
Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asn Phe Pro Asp Leu Ser	
245 250 255	
caa cag cag tta aaa aat ttc gcc gag gaa tat act aaa ggt cct aaa	816
Gln Gln Gln Leu Lys Asn Phe Ala Glu Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Lys	
260 265 270	
att cac gac tac gtg aat gaa atg aac aga gaa gta tta tcc cac tat	864
Ile His Asp Tyr Val Asn Glu Met Asn Arg Glu Val Leu Ser His Tyr	
275 280 285	
gat atc gcc act gcg ggg gaa ata ttt ggg gtt cct ctg gat aaa tcg	912
Asp Ile Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Lys Ser	
290 295 300	
att aag ttt ttc gat cgc cgt aga aat gaa tta aat ata gcg ttt acg	960
Ile Lys Phe Phe Asp Arg Arg Asn Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr	
305 310 315 320	
ttt gat ctg atc agg ctc gat cgt gat gct gat gaa aga tgg cgg cga	1008
Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ala Asp Glu Arg Trp Arg Arg	
325 330 335	
aaa gac tgg acc ctt tcg cag ttc cga aaa att gtc gat aag gtt gac	1056
Lys Asp Trp Thr Leu Ser Gln Phe Arg Lys Ile Val Asp Lys Val Asp	
340 345 350	
caa acg gca gga gag tat ggg tgg aat gcc ttt ttc tta gac aat cac	1104
Gln Thr Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His	
355 360 365	

gac aat ccc cgc gcg gtt tct cac ttt ggt gat gat cga cca caa tgg	1152
Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp	
370 375 380	
cgc gag cat gcg gcg aaa gca ctg gca aca ttg acg ctg acc cag cgt	1200
Arg Glu His Ala Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln Arg	
385 390 395 400	
gca acg ccg ttt atc tat cag ggt tca gaa ctc ggt atg acc aat tat	1248
Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr	
405 410 415	
ccc ttt aaa aaa atc gat gat ttc gat gat gta gag gtg aaa ggt ttt	1296
Pro Phe Lys Lys Ile Asp Asp Phe Asp Asp Val Glu Val Lys Gly Phe	
420 425 430	
tgg caa gac	1305
Trp Gln Asp	
435	
<210> 4	
<211> 435	
<212> PRT	
<213> Erwinia rhabontici	
<400> 4	
Met Ser Ser Gln Gly Leu Lys Thr Ala Xaa Ala Ile Phe Leu Ala Thr	
1 5 10 15	
Thr Phe Ser Ala Thr Ser Tyr Gln Ala Cys Ser Ala Xaa Pro Asp Thr	
20 25 30	
Ala Pro Ser Leu Thr Val Gln Gln Ser Asn Ala Leu Pro Thr Trp Trp	
35 40 45	
Lys Gln Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr	
50 55 60	
Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Leu Asn Gly Ile Ile Glu Asn Leu Asp	
65 70 75 80	
Tyr Leu Lys Lys Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr	
85 90 95	
Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys	
100 105 110	
Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser	
115 120 125	
Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Ile Val Ile Asn	
130 135 140	
His Thr Ser Asp Gln His Ala Trp Phe Val Gln Ser Lys Ser Gly Lys	
145 150 155 160	
Asn Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Gly	
165 170 175	
His Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Glu	
180 185 190	
Lys Asp Asp Lys Ser Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln	
195 200 205	
Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr	
210 215 220	
Asp Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe	
225 230 235 240	

Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asn Phe Pro Asp Leu Ser
 245 250 255
 Gln Gln Gln Leu Lys Asn Phe Ala Glu Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Lys
 260 265 270
 Ile His Asp Tyr Val Asn Glu Met Asn Arg Glu Val Leu Ser His Tyr
 275 280 285
 Asp Ile Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Lys Ser
 290 295 300
 Ile Lys Phe Phe Asp Arg Arg Asn Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr
 305 310 315 320
 Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ala Asp Glu Arg Trp Arg Arg
 325 330 335
 Lys Asp Trp Thr Leu Ser Gln Phe Arg Lys Ile Val Asp Lys Val Asp
 340 345 350
 Gln Thr Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His
 355 360 365
 Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp
 370 375 380
 Arg Glu His Ala Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln Arg
 385 390 395 400
 Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr
 405 410 415
 Pro Phe Lys Lys Ile Asp Asp Phe Asp Asp Val Glu Val Lys Gly Phe
 420 425 430
 Trp Gln Asp
 435

<210> 5
 <211> 1803
 <212> DNA
 <213> Erwinia rhabontici

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1800)
 <223> coding for sucrose isomerase

<400> 5
 atg tcc tct caa gga ttg aaa acg gct gtc gct att ttt ctt gca acc 48
 Met Ser Ser Gln Gly Leu Lys Thr Ala Val Ala Ile Phe Leu Ala Thr
 1 5 10 15
 act ttt tct gcc aca tcc tat cag gcc tgc agt gcc ggg cca gat acc 96
 Thr Phe Ser Ala Thr Ser Tyr Gln Ala Cys Ser Ala Gly Pro Asp Thr
 20 25 30
 gcc ccc tca ctc acc gtt cag caa tca aat gcc ctg ccc aca tgg tgg 144
 Ala Pro Ser Leu Thr Val Gln Gln Ser Asn Ala Leu Pro Thr Trp Trp
 35 40 45
 aag cag gct gtt ttt tat cag gta tat cca cgc tca ttt aaa gat acg 192
 Lys Gln Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr
 50 55 60
 aat ggg gat ggc att ggg gat tta aac ggt att att gag aat tta gac 240
 Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Leu Asn Gly Ile Ile Glu Asn Leu Asp
 65 70 75 80

tat ctg aag aaa ctg ggt att gat gcg att tgg atc aat cca cat tac	288
Tyr Leu Lys Lys Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr	
85 90 95	
gat tcg ccg aat acg gat aat ggt tat gac atc cgg gat tac cgt aag	336
Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys	
100 105 110	
ata atg aaa gaa tac ggt acg atg gaa gac ttt gac cgt ctt att tca	384
Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser	
115 120 125	
gaa atg aag aaa cgc aat atg cgt ttg atg att gat att gtt atc aac	432
Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Ile Val Ile Asn	
130 135 140	
cac acc agc gat cag cat gcc tgg ttt gtt cag agc aaa tcg ggt aag	480
His Thr Ser Asp Gln His Ala Trp Phe Val Gln Ser Lys Ser Gly Lys	
145 150 155 160	
aac aac ccc tac agg gac tat tac ttc tgg cgt gac ggt aag gat ggc	528
Asn Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Gly	
165 170 175	
cat gcc ccc aat aac tat ccc tcc ttc ttc ggt ggc tca gcc tgg gaa	576
His Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Glu	
180 185 190	
aaa gac gat aaa tca ggc cag tat tac ctc cat tac ttt gcc aaa cag	624
Lys Asp Asp Lys Ser Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln	
195 200 205	
caa ccc gac ctc aac tgg gac aat ccc aaa gtc cgt caa gac ctg tat	672
Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr	
210 215 220	
gac atg ctc cgc ttc tgg tta gat aaa ggc gtt tct ggt tta cgc ttt	720
Asp Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe	
225 230 235 240	
gat acc gtt gcc acc tac tcg aaa atc ccg aac ttc cct gac ctt agc	768
Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asn Phe Pro Asp Leu Ser	
245 250 255	
caa cag cag tta aaa aat ttc gcc gag gaa tat act aaa ggt cct aaa	816
Gln Gln Gln Leu Lys Asn Phe Ala Glu Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Lys	
260 265 270	
att cac gac tac gtg aat gaa atg aac aga gaa gta tta tcc cac tat	864
Ile His Asp Tyr Val Asn Glu Met Asn Arg Glu Val Leu Ser His Tyr	
275 280 285	
gat atc gcc act gcg ggg gaa ata ttt ggg gtt cct ctg gat aaa tcg	912
Asp Ile Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Lys Ser	
290 295 300	
att aag ttt ttc gat cgc cgt aga aat gaa tta aat ata gcg ttt acg	960
Ile Lys Phe Phe Asp Arg Arg Asn Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr	
305 310 315 320	
ttt gat ctg atc agg ctc gat cgt gat gct gat gaa aga tgg cgg cga	1008
Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ala Asp Glu Arg Trp Arg Arg	
325 330 335	
aaa gac tgg acc ctt tcg cag ttc cga aaa att gtc gat aag gtt gac	1056
Lys Asp Trp Thr Leu Ser Gln Phe Arg Lys Ile Val Asp Lys Val Asp	
340 345 350	

caa acg gca gga gag tat ggg tgg aat gcc ttt ttc tta gac aat cac	355	360	365	1104
Gln Thr Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His				
gac aat ccc cgc gcg gtt tct cac ttt ggt gat gat cga cca caa tgg	370	375	380	1152
Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp				
cgc gag cat gcg gcg aaa gca ctg gca aca ttg acg ctg acc cag cgt	385	390	395	1200
Arg Glu His Ala Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln Arg				
gca acg ccg ttt atc tat cag ggt tca gaa ctc ggt atg acc aat tat	405	410	415	1248
Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr				
ccc ttt aaa aaa atc gat gat ttc gat gat gta gag gtg aaa ggt ttt	420	425	430	1296
Pro Phe Lys Lys Ile Asp Asp Phe Asp Asp Val Glu Val Lys Gly Phe				
tgg caa gac tac gtt gaa aca ggc aaa gtg aaa gct gag gaa ttc ctt	435	440	445	1344
Trp Gln Asp Tyr Val Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala Glu Glu Phe Leu				
caa aac gta cgc caa acc agc cgt gat aac agc aga acc ccc ttc cag	450	455	460	1392
Gln Asn Val Arg Gln Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln				
tgg gat gca agc aaa aac gcg ggc ttt acc agt gga acc ccc tgg tta	465	470	475	1440
Trp Asp Ala Ser Lys Asn Ala Gly Phe Thr Ser Gly Thr Pro Trp Leu				
aaa atc aat ccc aat tat aaa gaa atc aac agc gca gat cag att aat	485	490	495	1488
Lys Ile Asn Pro Asn Tyr Lys Glu Ile Asn Ser Ala Asp Gln Ile Asn				
aat cca aat tcc gta ttt aac tat tat aga aag ctg att aac att cgc	500	505	510	1536
Asn Pro Asn Ser Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Lys Leu Ile Asn Ile Arg				
cat gac atc cct gcc ttg acc tac ggc agt tat att gat tta gac cct	515	520	525	1584
His Asp Ile Pro Ala Leu Thr Tyr Gly Ser Tyr Ile Asp Leu Asp Pro				
gac aac aat tca gtc tat gct tac acc cga acg ctc ggc gct gaa aaa	530	535	540	1632
Asp Asn Asn Ser Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Thr Leu Gly Ala Glu Lys				
tat ctt gtg gtc att aat ttt aaa gaa gaa gtg atg cac tac acc ctg	545	550	555	1680
Tyr Leu Val Val Ile Asn Phe Lys Glu Val Met His Tyr Thr Leu				
ccc ggg gat tta tcc atc aat aag gtg att act gaa aac aac agt cac	565	570	575	1728
Pro Gly Asp Leu Ser Ile Asn Lys Val Ile Thr Glu Asn Asn Ser His				
act att gtg aat aaa aat gac agg caa ctc cgt ctt gaa ccc tgg cag	580	585	590	1776
Thr Ile Val Asn Lys Asn Asp Arg Gln Leu Arg Leu Glu Pro Trp Gln				
tcg ggc att tat aaa ctt aat ccg tag	595	600		1803
Ser Gly Ile Tyr Lys Leu Asn Pro				
<210> 6				
<211> 600				
<212> PRT				
<213> Erwinia rhabontici				

<400> 6

Met	Ser	Ser	Gln	Gly	Leu	Lys	Thr	Ala	Val	Ala	Ile	Phe	Leu	Ala	Thr
1				5					10					15	
Thr	Phe	Ser	Ala	Thr	Ser	Tyr	Gln	Ala	Cys	Ser	Ala	Gly	Pro	Asp	Thr
	20					25							30		
Ala	Pro	Ser	Leu	Thr	Val	Gln	Gln	Ser	Asn	Ala	Leu	Pro	Thr	Trp	Trp
	35				40						45				
Lys	Gln	Ala	Val	Phe	Tyr	Gln	Val	Tyr	Pro	Arg	Ser	Phe	Lys	Asp	Thr
	50				55					60					
Asn	Gly	Asp	Gly	Ile	Gly	Asp	Leu	Asn	Gly	Ile	Ile	Glu	Asn	Leu	Asp
	65				70				75				80		
Tyr	Leu	Lys	Lys	Leu	Gly	Ile	Asp	Ala	Ile	Trp	Ile	Asn	Pro	His	Tyr
	85					90							95		
Asp	Ser	Pro	Asn	Thr	Asp	Asn	Gly	Tyr	Asp	Ile	Arg	Asp	Tyr	Arg	Lys
						100			105			110			
Ile	Met	Lys	Glu	Tyr	Gly	Thr	Met	Glu	Asp	Phe	Asp	Arg	Leu	Ile	Ser
	115					120						125			
Glu	Met	Lys	Lys	Arg	Asn	Met	Arg	Leu	Met	Ile	Asp	Ile	Val	Ile	Asn
	130					135						140			
His	Thr	Ser	Asp	Gln	His	Ala	Trp	Phe	Val	Gln	Ser	Lys	Ser	Gly	Lys
	145					150				155				160	
Asn	Asn	Pro	Tyr	Arg	Asp	Tyr	Tyr	Phe	Trp	Arg	Asp	Gly	Lys	Asp	Gly
						165			170			175			
His	Ala	Pro	Asn	Asn	Tyr	Pro	Ser	Phe	Phe	Gly	Gly	Ser	Ala	Trp	Glu
						180			185			190			
Lys	Asp	Asp	Lys	Ser	Gly	Gln	Tyr	Tyr	Leu	His	Tyr	Phe	Ala	Lys	Gln
						195			200			205			
Gln	Pro	Asp	Leu	Asn	Trp	Asp	Asn	Pro	Lys	Val	Arg	Gln	Asp	Leu	Tyr
	210					215					220				
Asp	Met	Leu	Arg	Phe	Trp	Leu	Asp	Lys	Gly	Val	Ser	Gly	Leu	Arg	Phe
	225					230				235				240	
Asp	Thr	Val	Ala	Thr	Tyr	Ser	Lys	Ile	Pro	Asn	Phe	Pro	Asp	Leu	Ser
						245			250			255			
Gln	Gln	Gln	Leu	Lys	Asn	Phe	Ala	Glu	Glu	Tyr	Thr	Lys	Gly	Pro	Lys
						260			265			270			
Ile	His	Asp	Tyr	Val	Asn	Glu	Met	Asn	Arg	Glu	Val	Leu	Ser	His	Tyr
						275			280			285			
Asp	Ile	Ala	Thr	Ala	Gly	Glu	Ile	Phe	Gly	Val	Pro	Leu	Asp	Lys	Ser
	290					295					300				
Ile	Lys	Phe	Phe	Asp	Arg	Arg	Arg	Asn	Glu	Leu	Asn	Ile	Ala	Phe	Thr
	305					310				315				320	
Phe	Asp	Leu	Ile	Arg	Leu	Asp	Arg	Asp	Ala	Asp	Glu	Arg	Trp	Arg	Arg
						325			330			335			
Lys	Asp	Trp	Thr	Leu	Ser	Gln	Phe	Arg	Lys	Ile	Val	Asp	Lys	Val	Asp
						340			345			350			
Gln	Thr	Ala	Gly	Glu	Tyr	Gly	Trp	Asn	Ala	Phe	Phe	Leu	Asp	Asn	His
						355			360			365			
Asp	Asn	Pro	Arg	Ala	Val	Ser	His	Phe	Gly	Asp	Asp	Arg	Pro	Gln	Trp
						370			375			380			

Arg Glu His Ala Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln Arg
 385 390 395 400
 Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr
 405 410 415
 Pro Phe Lys Lys Ile Asp Asp Phe Asp Asp Val Glu Val Lys Gly Phe
 420 425 430
 Trp Gln Asp Tyr Val Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala Glu Glu Phe Leu
 435 440 445
 Gln Asn Val Arg Gln Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln
 450 455 460
 Trp Asp Ala Ser Lys Asn Ala Gly Phe Thr Ser Gly Thr Pro Trp Leu
 465 470 475 480
 Lys Ile Asn Pro Asn Tyr Lys Glu Ile Asn Ser Ala Asp Gln Ile Asn
 485 490 495
 Asn Pro Asn Ser Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Lys Leu Ile Asn Ile Arg
 500 505 510
 His Asp Ile Pro Ala Leu Thr Tyr Gly Ser Tyr Ile Asp Leu Asp Pro
 515 520 525
 Asp Asn Asn Ser Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Thr Leu Gly Ala Glu Lys
 530 535 540
 Tyr Leu Val Val Ile Asn Phe Lys Glu Glu Val Met His Tyr Thr Leu
 545 550 555 560
 Pro Gly Asp Leu Ser Ile Asn Lys Val Ile Thr Glu Asn Asn Ser His
 565 570 575
 Thr Ile Val Asn Lys Asn Asp Arg Gln Leu Arg Leu Glu Pro Trp Gln
 580 585 590
 Ser Gly Ile Tyr Lys Leu Asn Pro
 595 600

<210> 7
 <211> 1803
 <212> DNA
 <213> *Protaminobacter rubrum*
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(1800)
 <223> coding for sucrose isomerase
 <400> 7
 atg ccc cgt caa gga ttg aaa act gca cta gcg att ttt cta acc aca 48
 Met Pro Arg Gln Gly Leu Lys Thr Ala Leu Ala Ile Phe Leu Thr Thr
 1 5 10 15
 tca tta tgc atc tca tgc cag caa gcc ttc ggt acg caa caa ccc ttg 96
 Ser Leu Cys Ile Ser Cys Gln Gln Ala Phe Gly Thr Gln Gln Pro Leu
 20 25 30
 ctt aac gaa aag agt atc gaa cag tcg aaa acc ata cct aaa tgg tgg 144
 Leu Asn Glu Lys Ser Ile Glu Gln Ser Lys Thr Ile Pro Lys Trp Trp
 35 40 45
 aag gag gct gtt ttt tat cag gtg tat ccg cgc tcc ttt aaa gac acc 192
 Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr
 50 55 60

aac gga gat ggc atc ggg gat att aac ggc atc ata gaa aaa tta gac	65	70	75	80	240
Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Ile Asn Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp					
tat cta aaa gcc ttg ggg att gat gcc att tgg atc aac cca cat tat	85	90	95		288
Tyr Leu Lys Ala Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr					
gat tct ccg aac acg gat aat ggt tac gat ata cgt gat tat cga aaa	100	105	110		336
Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys					
atc atg aaa gaa tat ggc acg atg gag gat ttt gac cgc ctg att tct	115	120	125		384
Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser					
gaa atg aaa aaa cgg aat atg cgg ttg atg att gat gtg gtc atc aac	130	135	140		432
Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn					
cac acc agc gat caa aac gaa tgg ttt gtt aaa agt aaa agc agt aag	145	150	155	160	480
His Thr Ser Asp Gln Asn Glu Trp Phe Val Lys Ser Lys Ser Ser Lys					
gat aat cct tat cgc ggc tat tat ttc tgg aaa gat gct aaa gaa ggg	165	170	175		528
Asp Asn Pro Tyr Arg Gly Tyr Tyr Phe Trp Lys Asp Ala Lys Glu Gly					
cag gcg cct aat aat tac cct tca ttc ttt ggt ggc tcg gcg tgg caa	180	185	190		576
Gln Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln					
aaa gat gaa aag acc aat caa tac tac ctg cac tat ttt gct aaa caa	195	200	205		624
Lys Asp Glu Lys Thr Asn Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln					
cag cct gac cta aac tgg gat aat ccc aaa gtc cgt caa gat ctt tat	210	215	220		672
Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr					
gca atg tta cgt ttc tgg tta gat aaa ggc gtg tct ggt tta cgt ttt	225	230	235	240	720
Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe					
gat acg gta gcg acc tac tca aaa att ccg gat ttc cca aat ctc acc	245	250	255		768
Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asp Phe Pro Asn Leu Thr					
caa caa cag ctg aag aat ttt gca gcg gag tat acc aag ggc cct aat	260	265	270		816
Gln Gln Gln Leu Lys Asn Phe Ala Ala Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Asn					
att cat cgt tac gtc aat gaa atg aat aaa gag gtc ttg tct cat tac	275	280	285		864
Ile His Arg Tyr Val Asn Glu Met Asn Lys Glu Val Leu Ser His Tyr					
gac att gcg act gcc ggt gaa atc ttt ggc gta ccc ttg gat caa tcg	290	295	300		912
Asp Ile Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Gln Ser					
ata aag ttc ttc gat cgc cgc cgt gat gag ctg aac att gca ttt acc	305	310	315	320	960
Ile Lys Phe Phe Asp Arg Arg Asp Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr					
ttt gac tta atc aga ctc gat cga gac tct gat caa aga tgg cgt cga	325	330	335		1008
Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ser Asp Gln Arg Trp Arg Arg					

aaa gat tgg aaa ttg tcg caa ttc cgg cag atc atc gat aac gtt gac	1056
Lys Asp Trp Lys Leu Ser Gln Phe Arg Gln Ile Ile Asp Asn Val Asp	
340 345 350	
cgt act gca gga gaa tat ggt tgg aat gcc ttc ttc ttg gat aac cac	1104
Arg Thr Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His	
355 360 365	
gac aat ccg cgc gct gtc tcg cac ttt ggc gat gat cgc cca caa tgg	1152
Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp	
370 375 380	
cgt gag cca tcg gct aaa gcg ctt gca acc ttg acg ctg act caa cga	1200
Arg Glu Pro Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln Arg	
385 390 395 400	
gca aca cct ttt att tat caa ggt tca gaa ttg ggc atg acc aat tac	1248
Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr	
405 410 415	
ccg ttt aaa gct att gat gaa ttc gat gat att gag gtg aaa ggt ttt	1296
Pro Phe Lys Ala Ile Asp Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe	
420 425 430	
tgg cat gac tac gtt gag aca gga aag gtc aaa gcc gac gag ttc ttg	1344
Trp His Asp Tyr Val Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala Asp Glu Phe Leu	
435 440 445	
caa aat gta cgc ctg acg agc agg gat aac agc cgg acg ccg ttc caa	1392
Gln Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln	
450 455 460	
tgg gat ggg agc aaa aat gca gga ttc acg agc gga aaa cct tgg ttc	1440
Trp Asp Gly Ser Lys Asn Ala Gly Phe Thr Ser Gly Lys Pro Trp Phe	
465 470 475 480	
aag gtc aac cca aac tac cag gaa atc aat gca gta agt caa gtc aca	1488
Lys Val Asn Pro Asn Tyr Gln Glu Ile Asn Ala Val Ser Gln Val Thr	
485 490 495	
caa ccc gac tca gta ttt aac tat tat cgt cag ttg atc aag ata agg	1536
Gln Pro Asp Ser Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Gln Leu Ile Lys Ile Arg	
500 505 510	
cat gac atc ccg gca. ctg acc tat ggt aca tac acc gat ttg gat cct	1584
His Asp Ile Pro Ala Leu Thr Tyr Gly Thr Tyr Thr Asp Leu Asp Pro	
515 520 525	
gca aat gat tcg gtc tac gcc tat aca cgc agc ctt ggg gcg gaa aaa	1632
Ala Asn Asp Ser Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Ser Leu Gly Ala Glu Lys	
530 535 540	
tat ctt gtt gtt aac ttc aag gag caa atg atg aga tat aaa tta	1680
Tyr Leu Val Val Asn Phe Lys Glu Gln Met Met Arg Tyr Lys Leu	
545 550 555 560	
ccg gat aat tta tcc att gag aaa gtg att ata gac agc aac agc aaa	1728
Pro Asp Asn Leu Ser Ile Glu Lys Val Ile Ile Asp Ser Asn Ser Lys	
565 570 575	
aac gtg gtg aaa aag aat gat tca tta ctc gag cta aaa cca tgg cag	1776
Asn Val Val Lys Lys Asn Asp Ser Leu Leu Glu Leu Lys Pro Trp Gln	
580 585 590	
tca ggg gtt tat aaa cta aat caa taa	1803
Ser Gly Val Tyr Lys Leu Asn Gln	
595 600	

<210> 8

<211> 600

<212> PRT

<213> Protaminobacter rubrum

<400> 8

Met Pro Arg Gln Gly Leu Lys Thr Ala Leu Ala Ile Phe Leu Thr Thr
1 5 10 15Ser Leu Cys Ile Ser Cys Gln Gln Ala Phe Gly Thr Gln Gln Pro Leu
20 25 30Leu Asn Glu Lys Ser Ile Glu Gln Ser Lys Thr Ile Pro Lys Trp Trp
35 40 45Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr
50 55 60Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Ile Asn Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp
65 70 75 80Tyr Leu Lys Ala Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr
85 90 95Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys
100 105 110Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser
115 120 125Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn
130 135 140His Thr Ser Asp Gln Asn Glu Trp Phe Val Lys Ser Lys Ser Lys
145 150 155 160Asp Asn Pro Tyr Arg Gly Tyr Tyr Phe Trp Lys Asp Ala Lys Glu Gly
165 170 175Gln Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln
180 185 190Lys Asp Glu Lys Thr Asn Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln
195 200 205Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr
210 215 220Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe
225 230 235 240Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asp Phe Pro Asn Leu Thr
245 250 255Gln Gln Leu Lys Asn Phe Ala Ala Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Asn
260 265 270Ile His Arg Tyr Val Asn Glu Met Asn Lys Glu Val Leu Ser His Tyr
275 280 285Asp Ile Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Gln Ser
290 295 300Ile Lys Phe Phe Asp Arg Arg Asp Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr
305 310 315 320Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ser Asp Gln Arg Trp Arg Arg
325 330 335Lys Asp Trp Lys Leu Ser Gln Phe Arg Gln Ile Ile Asp Asn Val Asp
340 345 350

Arg Thr Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His
 355 360 365
 Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp
 370 375 380
 Arg Glu Pro Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln Arg
 385 390 395 400
 Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr
 405 410 415
 Pro Phe Lys Ala Ile Asp Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe
 420 425 430
 Trp His Asp Tyr Val Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala Asp Glu Phe Leu
 435 440 445
 Gln Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln
 450 455 460
 Trp Asp Gly Ser Lys Asn Ala Gly Phe Thr Ser Gly Lys Pro Trp Phe
 465 470 475 480
 Lys Val Asn Pro Asn Tyr Gln Glu Ile Asn Ala Val Ser Gln Val Thr
 485 490 495
 Gln Pro Asp Ser Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Gln Leu Ile Lys Ile Arg
 500 505 510
 His Asp Ile Pro Ala Leu Thr Tyr Gly Thr Tyr Thr Asp Leu Asp Pro
 515 520 525
 Ala Asn Asp Ser Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Ser Leu Gly Ala Glu Lys
 530 535 540
 Tyr Leu Val Val Val Asn Phe Lys Glu Gln Met Met Arg Tyr Lys Leu
 545 550 555 560
 Pro Asp Asn Leu Ser Ile Glu Lys Val Ile Ile Asp Ser Asn Ser Lys
 565 570 575
 Asn Val Val Lys Lys Asn Asp Ser Leu Leu Glu Leu Lys Pro Trp Gln
 580 585 590
 Ser Gly Val Tyr Lys Leu Asn Gln
 595 600

<210> 9

<211> 1794

<212> DNA

<213> Enterobacter sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1791)

<223> coding for sucrose isomerase

<400> 9

atg tct ttt gtt acg cta cgt acc ggg gtg gct gtc gcg ctg tca tct 48
 Met Ser Phe Val Thr Leu Arg Thr Gly Val Ala Val Ala Leu Ser Ser
 1 5 10 15

ttg ata ata agt ctg gcc tgc ccg gct gtc agt gct gca cca tcc ttg 96
 Leu Ile Ile Ser Leu Ala Cys Pro Ala Val Ser Ala Ala Pro Ser Leu
 20 25 30

aat cag gat att cac gtt caa aag gaa agt gaa tat cct gca tgg tgg 144
 Asn Gln Asp Ile His Val Gln Lys Glu Ser Glu Tyr Pro Ala Trp Trp
 35 40 45

aaa gaa gct gtt tat cag atc tat cct cgc tca ttt aaa gac acc	192
Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Ile Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr	
50 55 60	
aat gat gat ggc att ggc gat att cgc ggt att att gaa aag ctg gac	240
Asn Asp Asp Gly Ile Gly Asp Ile Arg Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp	
65 70 75 80	
tat ctg aaa tcg ctc ggt att gac gct atc tgg atc aat ccc cat tac	288
Tyr Leu Lys Ser Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr	
85 90 95	
gac tct ccg aac acc gat aac ggc tat gac atc agt aat tat cgt cag	336
Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Ser Asn Tyr Arg Gln	
100 105 110	
ata atg aaa gag tat ggc aca atg gag gat ttt gat agc ctt gtt gcc	384
Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Ser Leu Val Ala	
115 120 125	
gaa atg aaa aaa cga aat atg cgc tta atg atc gac gtg gtc att aac	432
Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn	
130 135 140	
cat acc agt gat caa cac ccg tgg ttt att cag agt aaa agc gat aaa	480
His Thr Ser Asp Gln His Pro Trp Phe Ile Gln Ser Lys Ser Asp Lys	
145 150 155 160	
aac aac cct tat cgt gac tat tat ttc tgg cgt gac gga aaa gat aat	528
Asn Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Asn	
165 170 175	
cag cca cct aat aat tac ccc tca ttt ttc ggc ggc tcg gca tgg caa	576
Gln Pro Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln	
180 185 190	
aaa gat gca aag tca gga cag tac tat tta cac tat ttt gcc aga cag	624
Lys Asp Ala Lys Ser Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Arg Gln	
195 200 205	
caa cct gat ctc aac tgg gat aac ccg aaa gta cgt gag gat ctt tac	672
Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Glu Asp Leu Tyr	
210 215 220	
gca atg ctc cgc ttc tgg ctg gat aaa ggc gtt tca ggc atg cga ttt	720
Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Met Arg Phe	
225 230 235 240	
gat acg gtg gca act tat tcc aaa atc ccg gga ttt ccc aat ctg aca	768
Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Gly Phe Pro Asn Leu Thr	
245 250 255	
cct gaa caa cag aaa aat ttt gct gaa caa tac acc atg ggd cct aat	816
Pro Glu Gln Gln Lys Asn Phe Ala Glu Gln Tyr Thr Met Xaa Pro Asn	
260 265 270	
att cat cga tac att cag gaa atg aac ccg aaa gtt ctg tcc cgg tat	864
Ile His Arg Tyr Ile Gln Glu Met Asn Arg Lys Val Leu Ser Arg Tyr	
275 280 285	
gat gtg gcc acc gcg ggt gaa att ttt ggc gtc ccg ctg gat cgt tcg	912
Asp Val Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Arg Ser	
290 295 300	
tcg cag ttt ttt gat cgc cgc cga cat gag ctg aat atg gcg ttt atg	960
Ser Gln Phe Phe Asp Arg Arg His Glu Leu Asn Met Ala Phe Met	
305 310 315 320	

ttt gac ctc att cgt ctc gat cgc gac agc aat gaa cgc tgg cgt cac		1008	
Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ser Asn Glu Arg Trp Arg His			
325	330	335	
aag tcg tgg tcg ctc tct cag ttc cgc cag atc atc agc aaa atg gat		1056	
Lys Ser Trp Ser Leu Ser Gln Phe Arg Gln Ile Ile Ser Lys Met Asp			
340	345	350	
gtc acg gtc gga aag tat ggc tgg aac acg ttc ttc tta gac aac cat		1104	
Val Thr Val Gly Lys Tyr Gly Trp Asn Thr Phe Phe Leu Asp Asn His			
355	360	365	
gac aac ccc cgt gcg gta tct cac ttc ggg gat gac agg ccc caa tgg		1152	
Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp			
370	375	380	
cgg gag gcg tcg gct aag gca ctg gcg acg att acc ctc act cag cgg		1200	
Arg Glu Ala Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Ile Thr Leu Thr Gln Arg			
385	390	395	400
gcg acg ccg ttt att tat cag ggt tca gag ctg gga atg act aat tat		1248	
Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr			
405	410	415	
ccc ttc agg caa ctc aac gaa ttt gac gac atc gag gtc aaa ggt ttc		1296	
Pro Phe Arg Gln Leu Asn Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe			
420	425	430	
tgg cag gat tat gtc cag agt gga aaa gtc acg gcc aca gag ttt ctc		1344	
Trp Gln Asp Tyr Val Gln Ser Gly Lys Val Thr Ala Thr Glu Phe Leu			
435	440	445	
gat aat gtg cgc ctg acg agc cgc gat aac agc aga aca cct ttc cag		1392	
Asp Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln			
450	455	460	
tgg aat gac acc ctg aat gct ggt ttt act cgc gga aag ccg tgg ttt		1440	
Trp Asn Asp Thr Leu Asn Ala Gly Phe Thr Arg Gly Lys Pro Trp Phe			
465	470	475	480
cac atc aac cca aac tat gtg gag atc aac scc gaa cgc gaa gaa acc		1488	
His Ile Asn Pro Asn Tyr Val Glu Ile Asn Xaa Glu Arg Glu Glu Thr			
485	490	495	
cgc gaa gat tca gtg ctg aat tac tat aaa aaa atg att cag cta cgc		1536	
Arg Glu Asp Ser Val Leu Asn Tyr Tyr Lys Lys Met Ile Gln Leu Arg			
500	505	510	
cac cat atc cct gct ctg gta tat ggc gcc tat cag gat ctt aat cca		1584	
His His Ile Pro Ala Leu Val Tyr Gly Ala Tyr Gln Asp Leu Asn Pro			
515	520	525	
cag gac aat acc gtt tat gcc tat acc cga acg ctg ggt aac gag cgt		1632	
Gln Asp Asn Thr Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Thr Leu Gly Asn Glu Arg			
530	535	540	
tat ctg gtc gtg aac ttt aag gag tac ccg gtc cgc tat act ctc		1680	
Tyr Leu Val Val Asn Phe Lys Glu Tyr Pro Val Arg Tyr Thr Leu			
545	550	555	560
ccg gct aat gat gcc atc gag gaa gtg gtc att gat act cag cag caa		1728	
Pro Ala Asn Asp Ala Ile Glu Glu Val Val Ile Asp Thr Gln Gln Gln			
565	570	575	
ggt gcg ccg cac agc aca tcc ctg tca ttg agc ccc tgg cag gca ggt		1776	
Gly Ala Pro His Ser Thr Ser Leu Ser Leu Ser Pro Trp Gln Ala Gly			
580	585	590	

gcg tat aag ctg cg^g taa
 Ala Tyr Lys Leu Arg
 595

1794

<210> 10
 <211> 597
 <212> PRT
 <213> Enterobacter sp.

<400> 10
 Met Ser Phe Val Thr Leu Arg Thr Gly Val Ala Val Ala Leu Ser Ser
 1 5 10 15
 Leu Ile Ile Ser Leu Ala Cys Pro Ala Val Ser Ala Ala Pro Ser Leu
 20 25 30
 Asn Gln Asp Ile His Val Gln Lys Glu Ser Glu Tyr Pro Ala Trp Trp
 35 40 45
 Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Ile Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr
 50 55 60
 Asn Asp Asp Gly Ile Gly Asp Ile Arg Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp
 65 70 75 80
 Tyr Leu Lys Ser Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr
 85 90 95
 Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Ser Asn Tyr Arg Gln
 100 105 110
 Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Ser Leu Val Ala
 115 120 125
 Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn
 130 135 140
 His Thr Ser Asp Gln His Pro Trp Phe Ile Gln Ser Lys Ser Asp Lys
 145 150 155 160
 Asn Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Asn
 165 170 175
 Gln Pro Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln
 180 185 190
 Lys Asp Ala Lys Ser Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Arg Gln
 195 200 205
 Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Glu Asp Leu Tyr
 210 215 220
 Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Met Arg Phe
 225 230 235 240
 Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Gly Phe Pro Asn Leu Thr
 245 250 255
 Pro Glu Gln Gln Lys Asn Phe Ala Glu Gln Tyr Thr Met Xaa Pro Asn
 260 265 270
 Ile His Arg Tyr Ile Gln Glu Met Asn Arg Lys Val Leu Ser Arg Tyr
 275 280 285
 Asp Val Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Arg Ser
 290 295 300
 Ser Gln Phe Phe Asp Arg Arg Arg His Glu Leu Asn Met Ala Phe Met
 305 310 315 320
 Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ser Asn Glu Arg Trp Arg His
 325 330 335

Lys Ser Trp Ser Leu Ser Gln Phe Arg Gln Ile Ile Ser Lys Met Asp
 340 345 350
 Val Thr Val Gly Lys Tyr Gly Trp Asn Thr Phe Phe Leu Asp Asn His
 355 360 365
 Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp
 370 375 380
 Arg Glu Ala Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Ile Thr Leu Thr Gln Arg
 385 390 395 400
 Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr
 405 410 415
 Pro Phe Arg Gln Leu Asn Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe
 420 425 430
 Trp Gln Asp Tyr Val Gln Ser Gly Lys Val Thr Ala Thr Glu Phe Leu
 435 440 445
 Asp Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln
 450 455 460
 Trp Asn Asp Thr Leu Asn Ala Gly Phe Thr Arg Gly Lys Pro Trp Phe
 465 470 475 480
 His Ile Asn Pro Asn Tyr Val Glu Ile Asn Xaa Glu Arg Glu Glu Thr
 485 490 495
 Arg Glu Asp Ser Val Leu Asn Tyr Tyr Lys Lys Met Ile Gln Leu Arg
 500 505 510
 His His Ile Pro Ala Leu Val Tyr Gly Ala Tyr Gln Asp Leu Asn Pro
 515 520 525
 Gln Asp Asn Thr Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Thr Leu Gly Asn Glu Arg
 530 535 540
 Tyr Leu Val Val Val Asn Phe Lys Glu Tyr Pro Val Arg Tyr Thr Leu
 545 550 555 560
 Pro Ala Asn Asp Ala Ile Glu Glu Val Val Ile Asp Thr Gln Gln Gln
 565 570 575
 Gly Ala Pro His Ser Thr Ser Leu Ser Leu Ser Pro Trp Gln Ala Gly
 580 585 590
 Ala Tyr Lys Leu Arg
 595

<210> 11
 <211> 1803
 <212> DNA
 <213> *Serratia plymuthica*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1800)
 <223> coding for sucrose isomerase

<400> 11

atg ccc cgt caa gga ttg aaa act gca cta gcg att ttt cta acc aca 48
 Met Pro Arg Gln Gly Leu Lys Thr Ala Leu Ala Ile Phe Leu Thr Thr
 1 5 10 15

tca tta agc gtc tca tgc cag caa gcc tta ggt acg caa caa ccc ttg 96
 Ser Leu Ser Val Ser Cys Gln Gln Ala Leu Gly Thr Gln Gln Pro Leu
 20 25 30

ctt aac gaa aag agt atc gaa cag tcg aaa acc ata cct aaa tgg tgg	144
Leu Asn Glu Lys Ser Ile Glu Gln Ser Lys Thr Ile Pro Lys Thr Trp	
35 40 45	
aag gag gct ttt tat cag gtg tat ccg cgt tcc ttt aaa gac act	192
Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr	
50 55 60	
aac ggg gat ggt atc ggg gat att aaa ggc atc ata gaa aaa tta gac	240
Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Ile Lys Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp	
65 70 75 80	
tat tta aaa gct ttg ggg att gat gcc att tgg atc aac cca cat tat	288
Tyr Leu Lys Ala Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr	
85 90 95	
gac tcc ccg aac acg gat aat ggt tac gat ata cgt gat tat cga aaa	336
Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys	
100 105 110	
atc atg aaa gaa tat ggc acg atg gag gat ttt gac cgc ctg att tct	384
Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser	
115 120 125	
gaa atg aaa aaa cgt aac atg cgg ttg atg att gat gtc gtc atc aac	432
Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn	
130 135 140	
cac acc agc gat caa aac gaa tgg ttt gtt aaa agt aaa agc agt aag	480
His Thr Ser Asp Gln Asn Glu Trp Phe Val Lys Ser Lys Ser Lys	
145 150 155 160	
gat aat cct tat cgt ggc tat tac ttc tgg aaa gat gct aaa gaa ggg	528
Asp Asn Pro Tyr Arg Gly Tyr Tyr Phe Trp Lys Asp Ala Lys Glu Gly	
165 170 175	
cag gcg cct aat aat tac cct tca ttc ttt ggt ggc tcg gcg tgg caa	576
Gln Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln	
180 185 190	
aaa gat gaa aag acc aat caa tac tac ctg cac tat ttt gct aaa caa	624
Lys Asp Glu Lys Thr Asn Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln	
195 200 205	
cag cct gac cta aac tgg gat aac ccc aaa gtc cgt caa gat ctt tat	672
Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr	
210 215 220	
gca atg ttg cgt ttc tgg tta gat aaa ggc gtc tct ggt tta cgc ttt	720
Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe	
225 230 235 240	
gat acg gta gcg acc tac tca aaa att ccg gac ttc cca aat ctc acc	768
Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asp Phe Pro Asn Leu Thr	
245 250 255	
caa caa cag ctg aag aat ttt gca gct gag tat acc aag ggc cct aat	816
Gln Gln Gln Leu Lys Asn Phe Ala Ala Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Asn	
260 265 270	
att cat cgt tac gtc aat gaa atg aat aga gaa gtt ttg tct cat tac	864
Ile His Arg Tyr Val Asn Glu Met Asn Arg Glu Val Leu Ser His Tyr	
275 280 285	
gac att gcc act gcc ggt gaa atc ttt ggc gta ccc ttg gat caa tcg	912
Asp Ile Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Gln Ser	
290 295 300	

ata aaa ttc ttc gat cgc cgt cgc gat gag ctg aac atc gca ttt acc Ile Lys Phe Phe Asp Arg Arg Arg Asp Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr 305 310 315 320	960
ttt gac tta atc aga ctc gat cga gac tct gat caa aga tgg cgt cga Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ser Asp Gln Arg Trp Arg Arg 325 330 335	1008
aaa gag tgg aaa ttg tcg caa ttc cga cag gtc atc gat aac gtt gac Lys Glu Trp Lys Leu Ser Gln Phe Arg Gln Val Ile Asp Asn Val Asp 340 345 350	1056
cgt act gcc ggc gaa tat ggt tgg aat gcc ttc ttc ttg gat aac cac Arg Thr Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His 355 360 365	1104
gac aat ccg cgc gct gtc tcc cac ttt ggc gat gat cgc cca caa tgg Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp 370 375 380	1152
cgc gag cca tcg gct aaa gcg ctt gca acc ttg acg ctg act caa cga Arg Glu Pro Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln Arg 385 390 395 400	1200
gca acg cct ttt att tat caa ggt tca gaa ttg ggc atg acc aat tac Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr 405 410 415	1248
ccc ttc aaa gct att gat gaa ttc gat gat att gag gtg aaa ggt ttt Pro Phe Lys Ala Ile Asp Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe 420 425 430	1296
tgg cat gac tac gtt gag aca gga aag gtg aaa gcc gac gag ttc ttg Trp His Asp Tyr Val Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala Asp Glu Phe Leu 435 440 445	1344
caa aat gta cgc ctg acg agc agg gat aac agc cgg aca ccg ttc caa Gln Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln 450 455 460	1392
tgg gat acg agc aaa aat gca gga ttc acg agc gga aaa cct tgg ttc Trp Asp Thr Ser Lys Asn Ala Gly Phe Thr Ser Gly Lys Pro Trp Phe 465 470 475 480	1440
aag gtc aat cca aac tac cag gaa atc aat gcg gta agt caa gtc gca Lys Val Asn Pro Asn Tyr Gln Glu Ile Asn Ala Val Ser Gln Val Ala 485 490 495	1488
cag ccc gac tcg gta ttt aat tat tat cgt cag ttg atc aag ata agg Gln Pro Asp Ser Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Gln Leu Ile Lys Ile Arg 500 505 510	1536
cat aac atc ccg gca ctg acc tat ggc aca tac acc gat ttg gat cct His Asn Ile Pro Ala Leu Thr Tyr Gly Thr Tyr Thr Asp Leu Asp Pro 515 520 525	1584
gca aat gat tcg gtc tac gcc tat aca cgc agc ctt ggg gcg gaa aaa Ala Asn Asp Ser Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Ser Leu Gly Ala Glu Lys 530 535 540	1632
tat ctt gtt gtc gtt aac ttc cag gaa caa gtg atg aga tat aaa tta Tyr Leu Val Val Asn Phe Gln Glu Gln Val Met Arg Tyr Lys Leu 545 550 555 560	1680
ccg gat aat cta tcc atc gag aaa gtg att ata gaa agc aac agc aaa Pro Asp Asn Leu Ser Ile Glu Lys Val Ile Ile Glu Ser Asn Ser Lys 565 570 575	1728

aac gtt gtg aaa aag aat gat tcc tta ctc gaa cta aaa cca tgg cag 1776
 Asn Val Val Lys Lys Asn Asp Ser Leu Leu Glu Leu Lys Pro Trp Gln
 580 585 590
 tca ggg gtt tat aaa cta aat caa taa 1803
 Ser Gly Val Tyr Lys Leu Asn Gln
 595 600
 <210> 12
 <211> 600
 <212> PRT
 <213> *Serratia plymuthica*
 <400> 12
 Met Pro Arg Gln Gly Leu Lys Thr Ala Leu Ala Ile Phe Leu Thr Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Val Ser Cys Gln Gln Ala Leu Gly Thr Gln Gln Pro Leu
 20 25 30
 Leu Asn Glu Lys Ser Ile Glu Gln Ser Lys Thr Ile Pro Lys Trp Trp
 35 40 45
 Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr
 50 55 60
 Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Ile Lys Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp
 65 70 75 80
 Tyr Leu Lys Ala Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr
 85 90 95
 Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys
 100 105 110
 Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser
 115 120 125
 Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn
 130 135 140
 His Thr Ser Asp Gln Asn Glu Trp Phe Val Lys Ser Lys Ser Lys
 145 150 155 160
 Asp Asn Pro Tyr Arg Gly Tyr Tyr Phe Trp Lys Asp Ala Lys Glu Gly
 165 170 175
 Gln Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln
 180 185 190
 Lys Asp Glu Lys Thr Asn Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln
 195 200 205
 Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr
 210 215 220
 Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe
 225 230 235 240
 Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asp Phe Pro Asn Leu Thr
 245 250 255
 Gln Gln Leu Lys Asn Phe Ala Ala Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Asn
 260 265 270
 Ile His Arg Tyr Val Asn Glu Met Asn Arg Glu Val Leu Ser His Tyr
 275 280 285
 Asp Ile Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Gln Ser
 290 295 300

Ile Lys Phe Phe Asp Arg Arg Arg Asp Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr
 305 310 315 320

Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ser Asp Gln Arg Trp Arg Arg
 325 330 335

Lys Glu Trp Lys Leu Ser Gln Phe Arg Gln Val Ile Asp Asn Val Asp
 340 345 350

Arg Thr Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His
 355 360 365

Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp
 370 375 380

Arg Glu Pro Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln Arg
 385 390 395 400

Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr
 405 410 415

Pro Phe Lys Ala Ile Asp Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe
 420 425 430

Trp His Asp Tyr Val Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala Asp Glu Phe Leu
 435 440 445

Gln Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln
 450 455 460

Trp Asp Thr Ser Lys Asn Ala Gly Phe Thr Ser Gly Lys Pro Trp Phe
 465 470 475 480

Lys Val Asn Pro Asn Tyr Gln Glu Ile Asn Ala Val Ser Gln Val Ala
 485 490 495

Gln Pro Asp Ser Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Gln Leu Ile Lys Ile Arg
 500 505 510

His Asn Ile Pro Ala Leu Thr Tyr Gly Thr Tyr Thr Asp Leu Asp Pro
 515 520 525

Ala Asn Asp Ser Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Ser Leu Gly Ala Glu Lys
 530 535 540

Tyr Leu Val Val Val Asn Phe Gln Glu Gln Val Met Arg Tyr Lys Leu
 545 550 555 560

Pro Asp Asn Leu Ser Ile Glu Lys Val Ile Ile Glu Ser Asn Ser Lys
 565 570 575

Asn Val Val Lys Lys Asn Asp Ser Leu Leu Glu Leu Lys Pro Trp Gln
 580 585 590

Ser Gly Val Tyr Lys Leu Asn Gln
 595 600

<210> 13

<211> 1844

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: coding for fusion-protein of signal peptide from proteinase inhibitor I and Sucrose isomerase from Erwinia rhabontici

<220>

<221> CDS

<222> (24)...(1835)

```

<220>
<221> sig_peptide
<222> (24)..(143)
<223> signal peptide from proteinase inhibitor I

<220>
<221> misc_feature
<222> (144)..(1835)
<223> coding for mature peptide of sucrose isomerase
      from Erwinia rhabontici (palI)

<400> 13
ggtaccctaa ttaattatcc atc atg gat gtt cac aag gaa gtt aat ttc gtt 53
      Met Asp Val His Lys Glu Val Asn Phe Val
      1           5           10

gct tac cta cta att gtt ctt gga tta ttg gta ctt gta agc gcg atg 101
Ala Tyr Leu Leu Ile Val Leu Gly Leu Leu Val Leu Val Ser Ala Met
      15          20          25

gag cat gtt gat gcg aag gct tgc acc gaa ttg ggg atc ctc acc gtt 149
Glu His Val Asp Ala Lys Ala Cys Thr Glu Leu Gly Ile Leu Thr Val
      30          35          40

cag caa tca aat gcc ctg ccc aca tgg tgg aag cag gct gtt ttt tat 197
Gln Gln Ser Asn Ala Leu Pro Thr Trp Trp Lys Gln Ala Val Phe Tyr
      45          50          55

cag gta tat cca cgc tca ttt aaa gat acg aat ggg gat ggc att ggg 245
Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr Asn Gly Asp Gly Ile Gly
      60          65          70

gat tta aac ggt att att gag aat tta gac tat ctg aag aaa ctg ggt 293
Asp Leu Asn Gly Ile Ile Glu Asn Leu Asp Tyr Leu Lys Lys Leu Gly
      75          80          85          90

att gat gcg att tgg atc aat cca cat tac gat tcg ccg aat acg gat 341
Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr Asp Ser Pro Asn Thr Asp
      95          100         105

aat ggt tat gac atc cgg gat tac cgt aag ata atg aaa gaa tac ggt 389
Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys Ile Met Lys Glu Tyr Gly
      110         115         120

acg atg gaa gac ttt gac cgt ctt att tca gaa atg aag aaa cgc aat 437
Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser Glu Met Lys Lys Arg Asn
      125         130         135

atg cgt ttg atg att gat att gtt atc aac cac acc agc gat cag cat 485
Met Arg Leu Met Ile Asp Ile Val Ile Asn His Thr Ser Asp Gln His
      140         145         150

gcc tgg ttt gtt cag agc aaa tcg ggt aag aac aac ccc tac agg gac 533
Ala Trp Phe Val Gln Ser Lys Ser Gly Lys Asn Asn Pro Tyr Arg Asp
      155         160         165         170

tat tac ttc tgg cgt gac ggt aag gat ggc cat gcc ccc aat aac tat 581
Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Gly His Ala Pro Asn Asn Tyr
      175         180         185

ccc tcc ttc ttc ggt ggc tca gcc tgg gaa aaa gac gat aaa tca ggc 629
Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Glu Lys Asp Asp Lys Ser Gly
      190         195         200

cag tat tac ctc cat tac ttt gcc aaa cag caa ccc gac ctc aac tgg 677
Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln Gln Pro Asp Leu Asn Trp
      205         210         215

```

gac aat ccc aaa gtc cgt caa gac ctg tat gac atg ctc cgc ttc tgg	725
Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr Asp Met Leu Arg Phe Trp	
220 225 230	
tta gat aaa ggc gtt tct ggt tta cgc ttt gat acc gtt gcc acc tac	773
Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe Asp Thr Val Ala Thr Tyr	
235 240 245 250	
tcg aaa atc ccg aac ttc cct gac ctt agc caa cag cag tta aaa aat	821
Ser Lys Ile Pro Asn Phe Pro Asp Leu Ser Gln Gln Leu Lys Asn	
255 260 265	
ttc gcc gag gaa tat act aaa ggt cct aaa att cac gac tac gtg aat	869
Phe Ala Glu Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Lys Ile His Asp Tyr Val Asn	
270 275 280	
gaa atg aac aga gaa gta tta tcc cac tat gat atc gcc act gcg ggg	917
Glu Met Asn Arg Glu Val Leu Ser His Tyr Asp Ile Ala Thr Ala Gly	
285 290 295	
gaa ata ttt ggg gtt cct ctg gat aaa tcg att aag ttt ttc gat cgc	965
Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Lys Ser Ile Lys Phe Phe Asp Arg	
300 305 310	
cgt aga aat gaa tta aat ata gcg ttt acg ttt gat ctg atc agg ctc	1013
Arg Arg Asn Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr Phe Asp Leu Ile Arg Leu	
315 320 325 330	
gat cgt gat gct gat gaa aga tgg cgg cga aaa gac tgg acc ctt tcg	1061
Asp Arg Asp Ala Asp Glu Arg Trp Arg Arg Lys Asp Trp Thr Leu Ser	
335 340 345	
cag ttc cga aaa att gtc gat aag gtt gac caa acg gca gga gag tat	1109
Gln Phe Arg Lys Ile Val Asp Lys Val Asp Gln Thr Ala Gly Glu Tyr	
350 355 360	
ggg tgg aat gcc ttt ttc tta gac aat cac gac aat ccc cgc gcg gtt	1157
Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His Asp Asn Pro Arg Ala Val	
365 370 375	
tct cac ttt ggt gat gat cga cca caa tgg cgc gag cat gcg gcg aaa	1205
Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp Arg Glu His Ala Ala Lys	
380 385 390	
gca ctg gca aca ttg acg ctg acc cag cgt gca acg ccg ttt atc tat	1253
Ala Leu Ala Thr Leu Thr Gln Arg Ala Thr Pro Phe Ile Tyr	
395 400 405 410	
cag ggt tca gaa ctc ggt atg acc aat tat ccc ttt aaa aaa atc gat	1301
Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr Pro Phe Lys Lys Ile Asp	
415 420 425	
gat ttc gat gat gta gag gtg aaa ggt ttt tgg caa gac tac gtt gaa	1349
Asp Phe Asp Asp Val Glu Val Lys Gly Phe Trp Gln Asp Tyr Val Glu	
430 435 440	
aca ggc aaa gtg aaa gct gag gaa ttc ctt caa aac gta cgc caa acc	1397
Thr Gly Lys Val Lys Ala Glu Glu Phe Leu Gln Asn Val Arg Gln Thr	
445 450 455	
agc cgt gat aac agc aga acc ccc ttc cag tgg gat gca agc aaa aac	1445
Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln Trp Asp Ala Ser Lys Asn	
460 465 470	
gcg ggc ttt acc agt gga acc ccc tgg tta aaa atc aat ccc aat tat	1493
Ala Gly Phe Thr Ser Gly Thr Pro Trp Leu Lys Ile Asn Pro Asn Tyr	
475 480 485 490	

aaa gaa atc aac agc gca gat cag att aat aat cca aat tcc gta ttt	1541		
Lys Glu Ile Asn Ser Ala Asp Gln Ile Asn Asn Pro Asn Ser Val Phe			
495	500	505	
aac tat tat aga aag ctg att aac att cgc cat gac atc cct gcc ttg	1589		
Asn Tyr Tyr Arg Lys Leu Ile Asn Ile Arg His Asp Ile Pro Ala Leu			
510	515	520	
acc tac ggc agt tat att gat tta gac cct gac aac aat tca gtc tat	1637		
Thr Tyr Gly Ser Tyr Ile Asp Leu Asp Pro Asp Asn Asn Ser Val Tyr			
525	530	535	
gct tac acc cga acg ctc ggc gct gaa aaa tat ctt gtg gtc att aat	1685		
Ala Tyr Thr Arg Thr Leu Gly Ala Glu Lys Tyr Leu Val Val Ile Asn			
540	545	550	
ttt aaa gaa gaa gtg atg cac tac acc ctg ccc ggg gat tta tcc atc	1733		
Phe Lys Glu Glu Val Met His Tyr Thr Leu Pro Gly Asp Leu Ser Ile			
555	560	565	570
aat aag gtg att act gaa aac aac agt cac act att gtg aat aaa aat	1781		
Asn Lys Val Ile Thr Glu Asn Asn Ser His Thr Ile Val Asn Lys Asn			
575	580	585	
gac agg caa ctc cgt ctt gaa ccc tgg cag tcg ggc att tat aaa ctt	1829		
Asp Arg Gln Leu Arg Leu Glu Pro Trp Gln Ser Gly Ile Tyr Lys Leu			
590	595	600	
aat ccg taggtcgac	1844		
Asn Pro			
<210> 14			
<211> 604			
<212> PRT			
<213> Künstliche Sequenz			
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: coding for			
fusion-protein of signal peptide from proteinase			
inhibitor I and Sucrose isomerase from <i>Erwinia</i>			
rhapontici			
<400> 14			
Met Asp Val His Lys Glu Val Asn Phe Val Ala Tyr Leu Leu Ile Val			
1	5	10	15
Leu Gly Leu Leu Val Leu Val Ser Ala Met Glu His Val Asp Ala Lys			
20	25	30	
Ala Cys Thr Glu Leu Gly Ile Leu Thr Val Gln Gln Ser Asn Ala Leu			
35	40	45	
Pro Thr Trp Trp Lys Gln Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser			
50	55	60	
Phe Lys Asp Thr Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Leu Asn Gly Ile Ile			
65	70	75	80
Glu Asn Leu Asp Tyr Leu Lys Lys Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile			
85	90	95	
Asn Pro His Tyr Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg			
100	105	110	
Asp Tyr Arg Lys Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp			
115	120	125	
Arg Leu Ile Ser Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp			
130	135	140	
Ile Val Ile Asn His Thr Ser Asp Gln His Ala Trp Phe Val Gln Ser			
145	150	155	160

Lys Ser Gly Lys Asn Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp
 165 170 175
 Gly Lys Asp Gly His Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly
 180 185 190
 Ser Ala Trp Glu Lys Asp Asp Lys Ser Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr
 195 200 205
 Phe Ala Lys Gln Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg
 210 215 220
 Gln Asp Leu Tyr Asp Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser
 225 230 235 240
 Gly Leu Arg Phe Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asn Phe
 245 250 255
 Pro Asp Leu Ser Gln Gln Leu Lys Asn Phe Ala Glu Glu Tyr Thr
 260 265 270
 Lys Gly Pro Lys Ile His Asp Tyr Val Asn Glu Met Asn Arg Glu Val
 275 280 285
 Leu Ser His Tyr Asp Ile Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro
 290 295 300
 Leu Asp Lys Ser Ile Lys Phe Phe Asp Arg Arg Asn Glu Leu Asn
 305 310 315 320
 Ile Ala Phe Thr Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ala Asp Glu
 325 330 335
 Arg Trp Arg Arg Lys Asp Trp Thr Leu Ser Gln Phe Arg Lys Ile Val
 340 345 350
 Asp Lys Val Asp Gln Thr Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe
 355 360 365
 Leu Asp Asn His Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp
 370 375 380
 Arg Pro Gln Trp Arg Glu His Ala Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr
 385 390 395 400
 Leu Thr Gln Arg Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly
 405 410 415
 Met Thr Asn Tyr Pro Phe Lys Lys Ile Asp Asp Phe Asp Asp Val Glu
 420 425 430
 Val Lys Gly Phe Trp Gln Asp Tyr Val Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala
 435 440 445
 Glu Glu Phe Leu Gln Asn Val Arg Gln Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg
 450 455 460
 Thr Pro Phe Gln Trp Asp Ala Ser Lys Asn Ala Gly Phe Thr Ser Gly
 465 470 475 480
 Thr Pro Trp Leu Lys Ile Asn Pro Asn Tyr Lys Glu Ile Asn Ser Ala
 485 490 495
 Asp Gln Ile Asn Asn Pro Asn Ser Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Lys Leu
 500 505 510
 Ile Asn Ile Arg His Asp Ile Pro Ala Leu Thr Tyr Gly Ser Tyr Ile
 515 520 525
 Asp Leu Asp Pro Asp Asn Asn Ser Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Thr Leu
 530 535 540

Gly Ala Glu Lys Tyr Leu Val Val Ile Asn Phe Lys Glu Glu Val Met
 545 550 555 560
 His Tyr Thr Leu Pro Gly Asp Leu Ser Ile Asn Lys Val Ile Thr Glu
 565 570 575
 Asn Asn Ser His Thr Ile Val Asn Lys Asn Asp Arg Gln Leu Arg Leu
 580 585 590
 Glu Pro Trp Gln Ser Gly Ile Tyr Lys Leu Asn Pro
 595 600

<210> 15
 <211> 2477
 <212> DNA
 <213> Klebsiella sp.
 <220>
 <221> CDS
 <222> (214)..(2007)
 <223> coding for sucrose isomerase
 <400> 15
 gatatcactg gtattatgg a gtattatact cccccc ttat ttactcatca aagccaggcg 60
 ttccactctg cctccggat ataa cttcc gggaaacaat cccttcctga aaataattat 120
 tggtaaccgga gtcatactct ggctattgat gatttacgct tttcttaat aacaattcgt 180
 ctcattcaca actgactttg caagggaaatt att atg tct ttt gtt acg cta cgt 234
 Met Ser Phe Val Thr Leu Arg
 1 5
 acc ggg gtg gct gtc gcg ctg tca tct ttg ata ata agt ctg gcc tgc 282
 Thr Gly Val Ala Val Ala Leu Ser Ser Leu Ile Ile Ser Leu Ala Cys
 10 15 20
 ccg gct gtc agt gct gca cca tcc ttg aat cag gat att cac gtt caa 330
 Pro Ala Val Ser Ala Ala Pro Ser Leu Asn Gln Asp Ile His Val Gln
 25 30 35
 aag gaa agt gaa tat cct gca tgg tgg aaa gaa gct gtt ttt tat cag 378
 Lys Glu Ser Glu Tyr Pro Ala Trp Trp Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln
 40 45 50 55
 atc tat cct cgc tca ttt aaa gac acc aat gat gat ggc att ggc gat 426
 Ile Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr Asn Asp Asp Gly Ile Gly Asp
 60 65 70
 att cgc ggt att att gaa aag ctg gac tat ctg aaa tcg ctc ggt att 474
 Ile Arg Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp Tyr Leu Lys Ser Leu Gly Ile
 75 80 85
 gac gct atc tgg atc aat ccc cat tac gac tct ccg aac acc gat aac 522
 Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn
 90 95 100
 ggc tat gac atc agt aat tat cgt cag ata atg aaa gag tat ggc aca 570
 Gly Tyr Asp Ile Ser Asn Tyr Arg Gln Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr
 105 110 115
 atg gag gat ttt gat agc ctt gtt gcc gaa atg aaa aaa cga aat atg 618
 Met Glu Asp Phe Asp Ser Leu Val Ala Glu Met Lys Lys Arg Asn Met
 120 125 130 135
 cgc tta atg atc gac gtg gtc att aac cat acc agt gat caa cac ccg 666
 Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn His Thr Ser Asp Gln His Pro
 140 145 150

tgg ttt att cag agt aaa agc gat aaa aac aac cct tat cgt gac tat	714
Trp Phe Ile Gln Ser Lys Ser Asp Lys Asn Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr	
155 160 165	
tat ttc tgg cgt gac gga aaa gat aat cag cca cct aat aat tac ccc	762
Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Asn Gln Pro Pro Asn Asn Tyr Pro	
170 175 180	
tca ttt ttc ggc ggc tcg gca tgg caa aaa gat gca aag tca gga cag	810
Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln Lys Asp Ala Lys Ser Gly Gln	
185 190 195	
tac tat tta cac tat ttt gcc aga cag caa cct gat ctc aac tgg gat	858
Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Arg Gln Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp	
200 205 210 215	
aac ccg aaa gta cgt gag gat ctt tac gca atg ctc cgc ttc tgg ctg	906
Asn Pro Lys Val Arg Glu Asp Leu Tyr Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu	
220 225 230	
gat aaa ggc gtt tca ggc atg cga ttt gat acg gtg gca act tat tcc	954
Asp Lys Gly Val Ser Gly Met Arg Phe Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser	
235 240 245	
aaa atc ccg gga ttt ccc aat ctg aca cct gaa caa cag aaa aat ttt	1002
Lys Ile Pro Gly Phe Pro Asn Leu Thr Pro Glu Gln Gln Lys Asn Phe	
250 255 260	
gct gaa caa tac acc atg ggg cct aat att cat cga tac att cag gaa	1050
Ala Glu Gln Tyr Thr Met Gly Pro Asn Ile His Arg Tyr Ile Gln Glu	
265 270 275	
atg aac ccg aaa gtt ctg tcc cgg tat gat gtg gcc acc gcg ggt gaa	1098
Met Asn Arg Lys Val Leu Ser Arg Tyr Asp Val Ala Thr Ala Gly Glu	
280 285 290 295	
att ttt ggc gtc ccg ctg gat cgt tcg tcg cag ttt ttt gat cgc cgc	1146
Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Arg Ser Ser Gln Phe Phe Asp Arg Arg	
300 305 310	
cga cat gag ctg aat atg gcg ttt atg ttt gac ctc att cgt ctc gat	1194
Arg His Glu Leu Asn Met Ala Phe Met Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp	
315 320 325	
cgc gac agc aat gaa cgc tgg cgt cac aag tcg tgg tcg ctc tct cag	1242
Arg Asp Ser Asn Glu Arg Trp Arg His Lys Ser Trp Ser Leu Ser Gln	
330 335 340	
ttc cgc cag atc atc agc aaa atg gat gtc acg gtc gga aag tat ggc	1290
Phe Arg Gln Ile Ile Ser Lys Met Asp Val Thr Val Gly Lys Tyr Gly	
345 350 355	
tgg aac acg ttc ttc tta gat aac cat gac aac ccc cgt gcg gta tct	1338
Trp Asn Thr Phe Phe Leu Asp Asn His Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser	
360 365 370 375	
cac ttc ggg gat gac agg ccg caa tgg cgg gag gcg tcg gct aag gca	1386
His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp Arg Glu Ala Ser Ala Lys Ala	
380 385 390	
ctg gcg acg att acc ctc act cag cgg gcg acg ccg ttt att tat cag	1434
Leu Ala Thr Ile Thr Leu Thr Gln Arg Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln	
395 400 405	
ggt tca gag ctg gga atg act aat tat ccc ttc agg caa ctc aac gaa	1482
Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr Pro Phe Arg Gln Leu Asn Glu	
410 415 420	

ttt gac gac atc gag gtc aaa ggt ttc tgg cag gat tat gtc cag agt 1530
 Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe Trp Gln Asp Tyr Val Gln Ser
 425 430 435
 gga aaa gtc acg gcc aca gag ttt ctc gat aat gtg cgc ctg acg agc 1578
 Gly Lys Val Thr Ala Thr Glu Phe Leu Asp Asn Val Arg Leu Thr Ser
 440 445 450 455
 cgc gat aac agc aga aca cct ttc cag tgg aat gac acc ctg aat gct 1626
 Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln Trp Asn Asp Thr Leu Asn Ala
 460 465 470
 ggt ttt act cgc gga aag ccg tgg ttt cac atc aac cca aac tat gtg 1674
 Gly Phe Thr Arg Gly Lys Pro Trp Phe His Ile Asn Pro Asn Tyr Val
 475 480 485
 gag atc aac gcc gaa cgc gaa gaa acc cgc gaa gat tca gtg ctg aat 1722
 Glu Ile Asn Ala Glu Arg Glu Glu Thr Arg Glu Asp Ser Val Leu Asn
 490 495 500
 tac tat aaa aaa atg att cag cta cgc cac cat atc cct gct ctg gta 1770
 Tyr Tyr Lys Lys Met Ile Gln Leu Arg His His Ile Pro Ala Leu Val
 505 510 515
 tat ggc gcc tat cag gat ctt aat cca cag gac aat acc gtt tat gcc 1818
 Tyr Gly Ala Tyr Gln Asp Leu Asn Pro Gln Asp Asn Thr Val Tyr Ala
 520 525 530 535
 tat acc cga acg ctg ggt aac gag cgt tat ctg gtc gtg gtg aac ttt 1866
 Tyr Thr Arg Thr Leu Gly Asn Glu Arg Tyr Leu Val Val Val Asn Phe
 540 545 550
 aag gag tac ccg gtc cgc tat act ctc ccg gct aat gat gcc atc gag 1914
 Lys Glu Tyr Pro Val Arg Tyr Thr Leu Pro Ala Asn Asp Ala Ile Glu
 555 560 565
 gaa gtg gtc att gat act cag cag cag gcg gct gcg ccg cac agc aca 1962
 Glu Val Val Ile Asp Thr Gln Gln Ala Ala Ala Pro His Ser Thr
 570 575 580
 tcc ctg tca ttg agc ccc tgg cag gca ggt gtg tat aag ctg cgg 2007
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Trp Gln Ala Gly Val Tyr Lys Leu Arg
 585 590 595
 taatcacctg ggggattgat gacaagttcc ccagacaata gagtttcca ggtctttgc 2067
 actgctgtgc tcagcgatag ttgtgtctc ctgtgacttc gtaagtgcct gtctcatggc 2127
 aggcattgtc aggtcagaag ctttcagg cagcctcgag taacagcgcc cagttagcat 2187
 cccctgaaa gatgggggtt atgtataat tagcgtaaa gaacatgaac cagccaccgt 2247
 catcttatca accaacaggg gagatgagct ccgattcctg attcttcaca ttgccgttga 2307
 tgcgcctgaa gcctcgccct tttagggccgg gaaataagca cagcatctgg cgatctctt 2367
 tgccacttta ctgatcacat ccggcctcat ccattccgg gcccgttcag ccatcaggag 2427
 aaagggtagt ggtcggttat atgagccagg ccaaaaaaag gtgtgatatac 2477
 <210> 16
 <211> 598
 <212> PRT
 <213> Klebsiella sp.
 <400> 16
 Met Ser Phe Val Thr Leu Arg Thr Gly Val Ala Val Ala Leu Ser Ser
 1 5 10 15
 Leu Ile Ile Ser Leu Ala Cys Pro Ala Val Ser Ala Ala Pro Ser Leu
 20 25 30

Asn	Gln	Asp	Ile	His	Val	Gln	Lys	Glu	Ser	Glu	Tyr	Pro	Ala	Trp	Trp
35							40						45		
Lys	Glu	Ala	Val	Phe	Tyr	Gln	Ile	Tyr	Pro	Arg	Ser	Phe	Lys	Asp	Thr
50							55						60		
Asn	Asp	Asp	Gly	Ile	Gly	Asp	Ile	Arg	Gly	Ile	Ile	Glu	Lys	Leu	Asp
65							70				75			80	
Tyr	Leu	Lys	Ser	Leu	Gly	Ile	Asp	Ala	Ile	Trp	Ile	Asn	Pro	His	Tyr
85								90					95		
Asp	Ser	Pro	Asn	Thr	Asp	Asn	Gly	Tyr	Asp	Ile	Ser	Asn	Tyr	Arg	Gln
100								105					110		
Ile	Met	Lys	Glu	Tyr	Gly	Thr	Met	Glu	Asp	Phe	Asp	Ser	Leu	Val	Ala
115							120						125		
Glu	Met	Lys	Lys	Arg	Asn	Met	Arg	Leu	Met	Ile	Asp	Val	Val	Ile	Asn
130							135						140		
His	Thr	Ser	Asp	Gln	His	Pro	Trp	Phe	Ile	Gln	Ser	Lys	Ser	Asp	Lys
145							150					155		160	
Asn	Asn	Pro	Tyr	Arg	Asp	Tyr	Tyr	Phe	Trp	Arg	Asp	Gly	Lys	Asp	Asn
165								170					175		
Gln	Pro	Pro	Asn	Asn	Tyr	Pro	Ser	Phe	Phe	Gly	Gly	Ser	Ala	Trp	Gln
180								185					190		
Lys	Asp	Ala	Lys	Ser	Gly	Gln	Tyr	Tyr	Leu	His	Tyr	Phe	Ala	Arg	Gln
195							200						205		
Gln	Pro	Asp	Leu	Asn	Trp	Asp	Asn	Pro	Lys	Val	Arg	Glu	Asp	Leu	Tyr
210								215					220		
Ala	Met	Leu	Arg	Phe	Trp	Leu	Asp	Lys	Gly	Val	Ser	Gly	Met	Arg	Phe
225							230					235		240	
Asp	Thr	Val	Ala	Thr	Tyr	Ser	Lys	Ile	Pro	Gly	Phe	Pro	Asn	Leu	Thr
245								250					255		
Pro	Glu	Gln	Gln	Lys	Asn	Phe	Ala	Glu	Gln	Tyr	Thr	Met	Gly	Pro	Asn
260								265					270		
Ile	His	Arg	Tyr	Ile	Gln	Glu	Met	Asn	Arg	Lys	Val	Leu	Ser	Arg	Tyr
275							280					285			
Asp	Val	Ala	Thr	Ala	Gly	Glu	Ile	Phe	Gly	Val	Pro	Leu	Asp	Arg	Ser
290							295					300			
Ser	Gln	Phe	Phe	Asp	Arg	Arg	Arg	His	Glu	Leu	Asn	Met	Ala	Phe	Met
305							310					315		320	
Phe	Asp	Leu	Ile	Arg	Leu	Asp	Arg	Asp	Ser	Asn	Glu	Arg	Trp	Arg	His
325								330					335		
Lys	Ser	Trp	Ser	Leu	Ser	Gln	Phe	Arg	Gln	Ile	Ile	Ser	Lys	Met	Asp
340							345						350		
Val	Thr	Val	Gly	Lys	Tyr	Gly	Trp	Asn	Thr	Phe	Phe	Leu	Asp	Asn	His
355							360						365		
Asp	Asn	Pro	Arg	Ala	Val	Ser	His	Phe	Gly	Asp	Asp	Arg	Pro	Gln	Trp
370							375						380		
Arg	Glu	Ala	Ser	Ala	Lys	Ala	Leu	Ala	Thr	Ile	Thr	Leu	Thr	Gln	Arg
385							390					395		400	
Ala	Thr	Pro	Phe	Ile	Tyr	Gln	Gly	Ser	Glu	Leu	Gly	Met	Thr	Asn	Tyr
405								410					415		

Pro Phe Arg Gln Leu Asn Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe
 420 425 430
 Trp Gln Asp Tyr Val Gln Ser Gly Lys Val Thr Ala Thr Glu Phe Leu
 435 440 445
 Asp Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln
 450 455 460
 Trp Asn Asp Thr Leu Asn Ala Gly Phe Thr Arg Gly Lys Pro Trp Phe
 465 470 475 480
 His Ile Asn Pro Asn Tyr Val Glu Ile Asn Ala Glu Arg Glu Glu Thr
 485 490 495
 Arg Glu Asp Ser Val Leu Asn Tyr Tyr Lys Lys Met Ile Gln Leu Arg
 500 505 510
 His His Ile Pro Ala Leu Val Tyr Gly Ala Tyr Gln Asp Leu Asn Pro
 515 520 525
 Gln Asp Asn Thr Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Thr Leu Gly Asn Glu Arg
 530 535 540
 Tyr Leu Val Val Val Asn Phe Lys Glu Tyr Pro Val Arg Tyr Thr Leu
 545 550 555 560
 Pro Ala Asn Asp Ala Ile Glu Glu Val Val Ile Asp Thr Gln Gln Gln
 565 570 575
 Ala Ala Ala Pro His Ser Thr Ser Leu Ser Leu Ser Pro Trp Gln Ala
 580 585 590
 Gly Val Tyr Lys Leu Arg
 595

<210> 17
 <211> 1797
 <212> DNA
 <213> Klebsiella sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(1794)
 <223> coding for sucrose isomerase

<400> 17
 atg tct ttt gtt acg cta cgt acc ggg gtg gct gtc gcg ctg tca tct 48
 Met Ser Phe Val Thr Leu Arg Thr Gly Val Ala Val Ala Leu Ser Ser
 1 5 10 15
 ttg ata ata agt ctg gcc tgc ccg gct gtc agt gct gca cca tcc ttg 96
 Leu Ile Ile Ser Leu Ala Cys Pro Ala Val Ser Ala Ala Pro Ser Leu
 20 25 30
 aat cag gat att cac gtt caa aag gaa agt gaa tat cct gca tgg tgg 144
 Asn Gln Asp Ile His Val Gln Lys Glu Ser Glu Tyr Pro Ala Trp Trp
 35 40 45
 aaa gaa gct gtt ttt tat cag atc tat cct cgc tca ttt aaa gac acc 192
 Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Ile Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr
 50 55 60
 aat gat gat ggc att ggc gat att cgc ggt att att gaa aag ctg gac 240
 Asn Asp Asp Gly Ile Gly Asp Ile Arg Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp
 65 70 75 80
 tat ctg aaa tcg ctc ggt att gac gct atc tgg atc aat ccc cat tac 288
 Tyr Leu Lys Ser Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr
 85 90 95

gac tct ccg aac acc gat aac ggc tat gac atc agt aat tat cgt cag	336
Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Ser Asn Tyr Arg Gln	
100 105 110	
ata atg aaa gag tat ggc aca atg gag gat ttt gat agc ctt gtt gcc	384
Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Ser Leu Val Ala	
115 120 125	
gaa atg aaa aaa cga aat atg cgc tta atg atc gac gtg gtc att aac	432
Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn	
130 135 140	
cat acc agt gat caa cac ccg tgg ttt att cag agt aaa agc gat aaa	480
His Thr Ser Asp Gln His Pro Trp Phe Ile Gln Ser Lys Ser Asp Lys	
145 150 155 160	
aac aac cct tat cgt gac tat tat ttc tgg cgt gac gga aaa gat aat	528
Asn Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Asn	
165 170 175	
cag cca cct aat aat tac ccc tca ttt ttc ggc ggc tcg gca tgg caa	576
Gln Pro Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln	
180 185 190	
aaa gat gca aag tca gga cag tac tat tta cac tat ttt gcc aga cag	624
Lys Asp Ala Lys Ser Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Arg Gln	
195 200 205	
caa cct gat ctc aac tgg gat aac ccg aaa gta cgt gag gat ctt tac	672
Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Glu Asp Leu Tyr	
210 215 220	
gca atg ctc cgc ttc tgg ctg gat aaa ggc gtt tca ggc atg cga ttt	720
Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Met Arg Phe	
225 230 235 240	
gat acg gtg gca act tat tcc aaa atc ccg gga ttt ccc aat ctg aca	768
Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Gly Phe Pro Asn Leu Thr	
245 250 255	
cct gaa caa cag aaa aat ttt gct gaa caa tac acc atg ggg cct aat	816
Pro Glu Gln Gln Lys Asn Phe Ala Glu Gln Tyr Thr Met Gly Pro Asn	
260 265 270	
att cat cga tac att cag gaa atg aac cgg aaa gtt ctg tcc cgg tat	864
Ile His Arg Tyr Ile Gln Glu Met Asn Arg Lys Val Leu Ser Arg Tyr	
275 280 285	
gat gtg gcc acc gcg ggt gaa att ttt ggc gtc ccg ctg gat cgt tcg	912
Asp Val Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Arg Ser	
290 295 300	
tcg cag ttt ttt gat cgc cgc cga cat gag ctg aat atg gcg ttt atg	960
Ser Gln Phe Phe Asp Arg Arg His Glu Leu Asn Met Ala Phe Met	
305 310 315 320	
ttt gac ctc att cgt ctc gat cgc gac agc aat gaa cgc tgg cgt cac	1008
Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ser Asn Glu Arg Trp Arg His	
325 330 335	
aag tcg tgg tcg ctc tct cag ttc cgc cag atc atc agc aaa atg gat	1056
Lys Ser Trp Ser Leu Ser Gln Phe Arg Gln Ile Ile Ser Lys Met Asp	
340 345 350	
gtc acg gtc gga aag tat ggc tgg aac acg ttc ttc tta gat aac cat	1104
Val Thr Val Gly Lys Tyr Gly Trp Asn Thr Phe Phe Leu Asp Asn His	
355 360 365	

gac aac ccc cgt gcg gta tct cac ttc ggg gat gac agg ccg caa tgg	1152
Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gin Trp	
370 375 380	
cgg gag gcg tcg gct aag gca ctg gcg acg att acc ctc act cag cgg	1200
Arg Glu Ala Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Ile Thr Leu Thr Gln Arg	
385 390 395 400	
gcg acg ccg ttt att tat cag ggt tca gag ctg gga atg act aat tat	1248
Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr	
405 410 415	
ccc ttc agg caa ctc aac gaa ttt gac gac atc gag gtc aaa ggt ttc	1296
Pro Phe Arg Gln Leu Asn Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe	
420 425 430	
tgg cag gat tat gtc cag agt gga aaa gtc acg gcc aca gag ttt ctc	1344
Trp Gln Asp Tyr Val Gln Ser Gly Lys Val Thr Ala Thr Glu Phe Leu	
435 440 445	
gat aat gtg cgc ctg acg agc cgc gat aac agc aga aca cct ttc cag	1392
Asp Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln	
450 455 460	
tgg aat gac acc ctg aat gct ggt ttt act cgc gga aag ccg tgg ttt	1440
Trp Asn Asp Thr Leu Asn Ala Gly Phe Thr Arg Gly Lys Pro Trp Phe	
465 470 475 480	
cac atc aac cca aac tat gtg gag atc aac gcc gaa cgc gaa gaa acc	1488
His Ile Asn Pro Asn Tyr Val Glu Ile Asn Ala Glu Arg Glu Glu Thr	
485 490 495	
cgc gaa gat tca gtg ctg aat tac tat aaa aaa atg att cag cta cgc	1536
Arg Glu Asp Ser Val Leu Asn Tyr Tyr Lys Lys Met Ile Gln Leu Arg	
500 505 510	
cac cat atc cct gct ctg gta tat ggc gcc tat cag gat ctt aat cca	1584
His His Ile Pro Ala Leu Val Tyr Gly Ala Tyr Gln Asp Leu Asn Pro	
515 520 525	
cag gac aat acc gtt tat gcc tat acc cga acg ctg ggt aac gag cgt	1632
Gln Asp Asn Thr Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Thr Leu Gly Asn Glu Arg	
530 535 540	
tat ctg gtc gtg aac ttt aag gag tac ccg gtc cgc tat act ctc	1680
Tyr Leu Val Val Val Asn Phe Lys Glu Tyr Pro Val Arg Tyr Thr Leu	
545 550 555 560	
ccg gct aat gat gcc atc gag gaa gtg gtc att gat act cag cag cag	1728
Pro Ala Asn Asp Ala Ile Glu Glu Val Val Ile Asp Thr Gln Gln Gln	
565 570 575	
gcg gct gcg ccg cac agc aca tcc ctg tca ttg agc ccc tgg cag gca	1776
Ala Ala Ala Pro His Ser Thr Ser Leu Ser Leu Ser Pro Trp Gln Ala	
580 585 590	
ggt gtg tat aag ctg cgg taa	1797
Gly Val Tyr Lys Leu Arg	
595	
<210> 18	
<211> 598	
<212> PRT	
<213> Klebsiella sp.	
<400> 18	
Met Ser Phe Val Thr Leu Arg Thr Gly Val Ala Val Ala Leu Ser Ser	
1 5 10 15	

Leu Ile Ile Ser Leu Ala Cys Pro Ala Val Ser Ala Ala Pro Ser Leu
 20 25 30

Asn Gln Asp Ile His Val Gln Lys Glu Ser Glu Tyr Pro Ala Trp Trp
 35 40 45

Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Ile Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr
 50 55 60

Asn Asp Asp Gly Ile Gly Asp Ile Arg Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp
 65 70 75 80

Tyr Leu Lys Ser Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr
 85 90 95

Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Ser Asn Tyr Arg Gln
 100 105 110

Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Ser Leu Val Ala
 115 120 125

Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn
 130 135 140

His Thr Ser Asp Gln His Pro Trp Phe Ile Gln Ser Lys Ser Asp Lys
 145 150 155 160

Asn Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Asn
 165 170 175

Gln Pro Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln
 180 185 190

Lys Asp Ala Lys Ser Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Arg Gln
 195 200 205

Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Glu Asp Leu Tyr
 210 215 220

Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Met Arg Phe
 225 230 235 240

Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Gly Phe Pro Asn Leu Thr
 245 250 255

Pro Glu Gln Gln Lys Asn Phe Ala Glu Gln Tyr Thr Met Gly Pro Asn
 260 265 270

Ile His Arg Tyr Ile Gln Glu Met Asn Arg Lys Val Leu Ser Arg Tyr
 275 280 285

Asp Val Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Arg Ser
 290 295 300

Ser Gln Phe Phe Asp Arg Arg Arg His Glu Leu Asn Met Ala Phe Met
 305 310 315 320

Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ser Asn Glu Arg Trp Arg His
 325 330 335

Lys Ser Trp Ser Leu Ser Gln Phe Arg Gln Ile Ile Ser Lys Met Asp
 340 345 350

Val Thr Val Gly Lys Tyr Gly Trp Asn Thr Phe Phe Leu Asp Asn His
 355 360 365

Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp
 370 375 380

Arg Glu Ala Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Ile Thr Leu Thr Gln Arg
 385 390 395 400

Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr
 405 410 415
 Pro Phe Arg Gln Leu Asn Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe
 420 425 430
 Trp Gln Asp Tyr Val Gln Ser Gly Lys Val Thr Ala Thr Glu Phe Leu
 435 440 445
 Asp Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln
 450 455 460
 Trp Asn Asp Thr Leu Asn Ala Gly Phe Thr Arg Gly Lys Pro Trp Phe
 465 470 475 480
 His Ile Asn Pro Asn Tyr Val Glu Ile Asn Ala Glu Arg Glu Thr
 485 490 495
 Arg Glu Asp Ser Val Leu Asn Tyr Tyr Lys Lys Met Ile Gln Leu Arg
 500 505 510
 His His Ile Pro Ala Leu Val Tyr Gly Ala Tyr Gln Asp Leu Asn Pro
 515 520 525
 Gln Asp Asn Thr Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Thr Leu Gly Asn Glu Arg
 530 535 540
 Tyr Leu Val Val Val Asn Phe Lys Glu Tyr Pro Val Arg Tyr Thr Leu
 545 550 555 560
 Pro Ala Asn Asp Ala Ile Glu Glu Val Val Ile Asp Thr Gln Gln Gln
 565 570 575
 Ala Ala Ala Pro His Ser Thr Ser Leu Ser Leu Ser Pro Trp Gln Ala
 580 585 590
 Gly Val Tyr Lys Leu Arg
 595

<210> 19
 <211> 471
 <212> DNA
 <213> Enterobacter sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(471)
 <223> coding for fragment of sucrose isomerase
 <400> 19
 gtt ttt tat cag atc tat cct cgc tca ttt aaa gac acc aat gat gat 48
 Val Phe Tyr Gln Ile Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr Asn Asp Asp
 1 5 10 15
 ggc att ggc gat att cgc ggt att att gaa aag ctg gac tat ctg aaa 96
 Gly Ile Gly Asp Ile Arg Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp Tyr Leu Lys
 20 25 30
 tcg ctc ggt att gac gct atc tgg atc aat ccc cat tac gac tct ccg 144
 Ser Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr Asp Ser Pro
 35 40 45
 aac acc gat aac ggc tat gac atc agt aat tat cgt cag ata atg aaa 192
 Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Ser Asn Tyr Arg Gln Ile Met Lys
 50 55 60
 gag tat ggc aca atg gag gat ttt gat agc ctt gtt gcc gaa atg aaa 240
 Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Ser Leu Val Ala Glu Met Lys
 65 70 75 80

aaa cga aat atg cgc tta atg atc gac gtg gtc att aac cat acc agt	288
Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn His Thr Ser	
85 90 95	
gat caa cac ccg tgg ttt att cag agt aaa agc gat aaa aac aac cct	336
Asp Gln His Pro Trp Phe Ile Gln Ser Lys Ser Asp Lys Asn Asn Pro	
100 105 110	
tat cgt gac tat tat ttc tgg cgt gac gga aaa gat aat cag cca cct	384
Tyr Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Asn Gln Pro Pro	
115 120 125	
aat aat tac ccc tca ttt ttc ggc ggc tcg gca tgg caa aaa gat gca	432
Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln Lys Asp Ala	
130 135 140	
aag tca gga cag tac tat tta cac tat ttt gcc aga cag	471
Lys Ser Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Arg Gln	
145 150 155	
<210> 20	
<211> 157	
<212> PRT	
<213> Enterobacter sp.	
<400> 20	
Val Phe Tyr Gln Ile Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr Asn Asp Asp	
1 5 10 15	
Gly Ile Gly Asp Ile Arg Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp Tyr Leu Lys	
20 25 30	
Ser Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr Asp Ser Pro	
35 40 45	
Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Ser Asn Tyr Arg Gln Ile Met Lys	
50 55 60	
Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Ser Leu Val Ala Glu Met Lys	
65 70 75 80	
Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn His Thr Ser	
85 90 95	
Asp Gln His Pro Trp Phe Ile Gln Ser Lys Ser Asp Lys Asn Asn Pro	
100 105 110	
Tyr Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Asn Gln Pro Pro	
115 120 125	
Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Ser Ala Trp Gln Lys Asp Ala	
130 135 140	
Lys Ser Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Arg Gln	
145 150 155	
<210> 21	
<211> 1782	
<212> DNA	
<213> Pseudomonas mesoacidophila MX45	
<220>	
<221> CDS	
<222> (1)..(1779)	
<223> coding for sucrose isomerase	
<400> 21	
atg ctt atg aag aga tta ttc gcc gcg tct ctg atg ctt gct ttt tca	48

Met	Leu	Met	Lys	Arg	Leu	Phe	Ala	Ala	Ser	Leu	Met	Leu	Ala	Phe	Ser		
1					5				10					15			
agc	gtc	tcc	tct	gtg	agg	gct	gag	gag	gcc	gta	aag	ccg	ggc	gcg	cca	96	
Ser	Val	Ser	Ser	Val	Arg	Ala	Glu	Glu	Ala	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Pro		
					20				25					30			
tgg	tgg	aaa	agt	gct	gtc	tcc	tat	cag	gtc	tat	ccg	cgc	tcg	ttc	aag	144	
Trp	Trp	Lys	Ser	Ala	Val	Phe	Tyr	Gln	Val	Tyr	Pro	Arg	Ser	Phe	Lys		
					35			40			45						
gat	acc	aac	ggt	gat	ggg	atc	ggc	gat	ttc	aaa	gga	ctg	acg	gag	aag	192	
Asp	Thr	Asn	Gly	Asp	Gly	Ile	Gly	Asp	Phe	Lys	Gly	Leu	Thr	Glu	Lys		
					50			55			60						
ctc	gac	tat	ctc	aag	ggg	ctc	ggc	ata	gac	gcc	atc	tgg	atc	aat	cca	240	
Leu	Asp	Tyr	Leu	Lys	Gly	Leu	Gly	Ile	Asp	Ala	Ile	Trp	Ile	Asn	Pro		
					65			70			75			80			
cat	tac	gcg	tct	ccc	aac	acc	gat	aat	ggc	tac	gat	atc	acg	gac	tat	288	
His	Tyr	Ala	Ser	Pro	Asn	Thr	Asp	Asn	Gly	Tyr	Asp	Ile	Ser	Asp	Tyr		
					85			90			95						
cga	gag	gtc	atg	aag	gaa	tat	ggg	acg	atg	gag	gac	ttc	gat	cgt	ctg	336	
Arg	Glu	Val	Met	Lys	Glu	Tyr	Gly	Thr	Met	Glu	Asp	Phe	Asp	Arg	Leu		
					100			105			110						
atg	gct	gag	ttg	aag	aag	cgc	ggc	atg	cg	ctc	atg	gtt	gat	gtc	gtg	384	
Met	Ala	Glu	Leu	Lys	Lys	Arg	Gly	Met	Arg	Leu	Met	Val	Asp	Val	Val		
					115			120			125						
atc	aac	cat	tcg	agt	gac	caa	cac	gaa	tgg	ttc	aag	acg	acg	cg	gcc	432	
Ile	Asn	His	Ser	Ser	Asp	Gln	His	Glu	Trp	Phe	Lys	Ser	Ser	Arg	Ala		
					130			135			140						
tcc	aaa	gac	aat	ccc	tac	cgt	gac	tat	tat	'ttc	tgg	cgt	gac	ggc	aaa	480	
Ser	Lys	Asp	Asn	Pro	Tyr	Arg	Asp	Tyr	Tyr	Phe	Trp	Arg	Asp	Gly	Lys		
					145			150			155			160			
gac	ggt	cac	gag	cca	aac	aat	tac	cct	tcc	ttc	ttc	ggc	ggt	tcg	gca	528	
Asp	Gly	His	Glu	Pro	Asn	Asn	Tyr	Pro	Ser	Phe	Phe	Gly	Gly	Ser	Ala		
					165			170			175						
tgg	gag	aag	gac	ccc	gta	acc	ggg	caa	tat	tac	ctg	cat	tat	ttc	ggt	576	
Trp	Glu	Lys	Asp	Pro	Val	Thr	Gly	Gln	Tyr	Tyr	Leu	His	Tyr	Phe	Gly		
					180			185			190						
cgt	cag	cag	cca	aat	tac	cct	tcc	ttc	ttc	ggc	ggt	tcg	gca		624		
Arg	Gln	Gln	Pro	Asp	Leu	Asn	Trp	Asp	Thr	Pro	Lys	Leu	Arg	Glu	Glu		
					195			200			205						
ctc	tat	gct	atg	ctg	cg	ttc	tgg	ctc	gac	aag	ggc	gta	tca	ggc	atg	672	
Leu	Tyr	Ala	Met	Leu	Arg	Phe	Trp	Leu	Asp	Lys	Gly	Val	Ser	Gly	Met		
					210			215			220						
cgg	ttc	gat	acg	gt	g	tt	tc	ac	tc	aag	aca	ccg	ggt	ttc	ccg	720	
Arg	Phe	Asp	Thr	Val	Ala	Thr	Tyr	Ser	Lys	Thr	Pro	Gly	Phe	Pro	Asp		
					225			230			235			240			
ctg	aca	ccg	gag	cag	atg	aag	aac	ttc	g	g	g	cc	tat	acc	cag	768	
Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Met	Lys	Asn	Phe	Ala	Glu	Ala	Tyr	Thr	Gln	Gly		
					245			250			255						
ccg	aac	ctt	cat	cgt	tac	ctg	cag	gaa	atg	cac	gag	aag	gtc	ttc	gat	816	
Pro	Asn	Leu	His	Arg	Tyr	Leu	Gln	Glu	Met	His	Glu	Lys	Val	Phe	Asp		
					260			265			270						
cat	tat	gac	g	cg	ac	g	cc	gg	atc	ttc	gg	g	c	cc	tc	aat	864
His	Tyr	Asp	Ala	Val	Thr	Ala	Gly	Glu	Ile	Phe	Gly	Ala	Pro	Leu	Asn		
					275			280			285						

caa gtg ccg ctg ttc atc gac agc cgg agg aaa gag ctg gat atg gct	912
Gln Val Pro Leu Phe Ile Asp Ser Arg Arg Lys Glu Leu Asp Met Ala	
290 295 300	
ttc acc ttc gat ctg atc cgt tat gat cgc gca ctg gat cgt tgg cat	960
Phe Thr Phe Asp Leu Ile Arg Tyr Asp Arg Ala Leu Asp Arg Trp His	
305 310 315 320	
acc att ccg cgt acc tta gcg gac ttc cgt caa acg atc gat aag gtc	1008
Thr Ile Pro Arg Thr Leu Ala Asp Phe Arg Gln Thr Ile Asp Lys Val	
325 330 335	
gac gcc atc gcg ggc gaa tat ggc tgg aac acg ttc ttc ctc ggc aat	1056
Asp Ala Ile Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Thr Phe Phe Leu Gly Asn	
340 345 350	
cac gac aat ccc cgt gcg gta tcg cat ttt ggt gac gat cgg ccg caa	1104
His Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln	
355 360 365	
tgg cgc gaa gcc tcg gcc aag gct ctg gcc acc gtc acc ttg acc cag	1152
Trp Arg Glu Ala Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Val Thr Leu Thr Gln	
370 375 380	
cga gga acg ccg ttc atc ttc caa gga gat gaa ctc gga atg acc aac	1200
Arg Gly Thr Pro Phe Ile Phe Gln Gly Asp Glu Leu Gly Met Thr Asn	
385 390 395 400	
tac ccc ttc aag acg ctg cag gac ttt gat gat atc nnn nnn nnn nnn	1248
Tyr Pro Phe Lys Thr Leu Gln Asp Phe Asp Asp Ile Xaa Xaa Xaa Xaa	
405 410 415	
nnn	1296
Xaa	
420 425 430	
nnn nnt gtg gcg ttg act	1344
Xaa Val Ala Leu Thr	
435 440 445	
agc cga gca aac gcc cgc acg ccc ttt caa tgg gat gac agt gct aat	1392
Ser Arg Ala Asn Ala Arg Thr Pro Phe Gln Trp Asp Asp Ser Ala Asn	
450 455 460	
gcg gga ttc aca act ggc aag cct tgg cta aag gtc aat cca aac tac	1440
Ala Gly Phe Thr Thr Gly Lys Pro Trp Leu Lys Val Asn Pro Asn Tyr	
465 470 475 480	
act gag atc aac gcc gcg cgg gaa att ggc gat cct aaa tcg gtc tac	1488
Thr Glu Ile Asn Ala Ala Arg Glu Ile Gly Asp Pro Lys Ser Val Tyr	
485 490 495	
agc ttt tac cgc aac ctg atc tca atc cgg cat gaa act ccc gct ctt	1536
Ser Phe Tyr Arg Asn Leu Ile Ser Ile Arg His Glu Thr Pro Ala Leu	
500 505 510	
tcg acc ggg agc tat cgc gac atc gat ccg agt aat gcc gat gtc tat	1584
Ser Thr Gly Ser Tyr Arg Asp Ile Asp Pro Ser Asn Ala Asp Val Tyr	
515 520 525	
gcc tat acg cgc agc cag gat ggc gag acc tat ctg gtc gta gtc aac	1632
Ala Tyr Thr Arg Ser Gln Asp Gly Glu Thr Tyr Leu Val Val Val Asn	
530 535 540	
ttc aag gca gag cca agg agt ttc acg ctt ccg gac ggc atg cat att	1680
Phe Lys Ala Glu Pro Arg Ser Phe Thr Leu Pro Asp Gly Met His Ile	
545 550 555 560	

gcc gaa acc ctg att gag agc agt tcg cca gca gct ccg gcg gcg ggg	1728
Ala Glu Thr Leu Ile Glu Ser Ser Ser Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly	
565 570 575	
gct gca agc ctt gag ctg cag cct tgg cag tcc ggc atc tac aag gtg	1776
Ala Ala Ser Leu Glu Leu Gln Pro Trp Gln Ser Gly Ile Tyr Lys Val	
580 585 590	
aag taa	1782
Lys	
<210> 22	
<211> 593	
<212> PRT	
<213> Pseudomonas mesoacidophila MX45	
<400> 22	
Met Leu Met Lys Arg Leu Phe Ala Ala Ser Leu Met Leu Ala Phe Ser	
1 5 10 15	
Ser Val Ser Ser Val Arg Ala Glu Glu Ala Val Lys Pro Gly Ala Pro	
20 . 25 30	
Trp Trp Lys Ser Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys	
35 40 45	
Asp Thr Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Phe Lys Gly Leu Thr Glu Lys	
50 55 60	
Leu Asp Tyr Leu Lys Gly Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro	
65 70 75 80	
His Tyr Ala Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Ser Asp Tyr	
85 90 95	
Arg Glu Val Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu	
100 105 110	
Met Ala Glu Leu Lys Lys Arg Gly Met Arg Leu Met Val Asp Val Val	
115 120 125	
Ile Asn His Ser Ser Asp Gln His Glu Trp Phe Lys Ser Ser Arg Ala	
130 . 135 140	
Ser Lys Asp Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys	
145 150 155 160	
Asp Gly His Glu Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala	
165 170 175	
Trp Glu Lys Asp Pro Val Thr Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Gly	
180 185 190	
Arg Gln Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Thr Pro Lys Leu Arg Glu Glu	
195 200 205	
Leu Tyr Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Met	
210 215 220	
Arg Phe Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Thr Pro Gly Phe Pro Asp	
225 230 235 240	
Leu Thr Pro Glu Gln Met Lys Asn Phe Ala Glu Ala Tyr Thr Gln Gly	
245 250 255	
Pro Asn Leu His Arg Tyr Leu Gln Glu Met His Glu Lys Val Phe Asp	
260 265 270	
His Tyr Asp Ala Val Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Ala Pro Leu Asn	
275 280 285	

Gln Val Pro Leu Phe Ile Asp Ser Arg Arg Lys Glu Leu Asp Met Ala
 290 295 300
 Phe Thr Phe Asp Leu Ile Arg Tyr Asp Arg Ala Leu Asp Arg Trp His
 305 310 315 320
 Thr Ile Pro Arg Thr Leu Ala Asp Phe Arg Gln Thr Ile Asp Lys Val
 325 330 335
 Asp Ala Ile Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Thr Phe Phe Leu Gly Asn
 340 345 350
 His Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln
 355 360 365
 Trp Arg Glu Ala Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Val Thr Leu Thr Gln
 370 375 380
 Arg Gly Thr Pro Phe Ile Phe Gln Gly Asp Glu Leu Gly Met Thr Asn
 385 390 395 400
 Tyr Pro Phe Lys Thr Leu Gln Asp Phe Asp Asp Ile Xaa Xaa Xaa Xaa
 405 410 415
 Xaa
 420 425 430
 Xaa Val Ala Leu Thr
 435 440 445
 Ser Arg Ala Asn Ala Arg Thr Pro Phe Gln Trp Asp Asp Ser Ala Asn
 450 455 460
 Ala Gly Phe Thr Thr Gly Lys Pro Trp Leu Lys Val Asn Pro Asn Tyr
 465 470 475 480
 Thr Glu Ile Asn Ala Ala Arg Glu Ile Gly Asp Pro Lys Ser Val Tyr
 485 490 495
 Ser Phe Tyr Arg Asn Leu Ile Ser Ile Arg His Glu Thr Pro Ala Leu
 500 505 510
 Ser Thr Gly Ser Tyr Arg Asp Ile Asp Pro Ser Asn Ala Asp Val Tyr
 515 520 525
 Ala Tyr Thr Arg Ser Gln Asp Gly Glu Thr Tyr Leu Val Val Val Asn
 530 535 540
 Phe Lys Ala Glu Pro Arg Ser Phe Thr Leu Pro Asp Gly Met His Ile
 545 550 555 560
 Ala Glu Thr Leu Ile Glu Ser Ser Ser Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
 565 570 575
 Ala Ala Ser Leu Glu Leu Gln Pro Trp Gln Ser Gly Ile Tyr Lys Val
 580 585 590

Lys

<210> 23
 <211> 1417
 <212> DNA
 <213> Lycopersicon esculentum
 <220>
 <221> promoter
 <222> (1)..(1417)
 <223> promoter of lemmi9

```

<400> 23
ataatttaac catctagaga tcccacaaatc atgttccat atcatggtag tagttggtgc 60
tacgaagtat ctataaatta ttgagaaata cctggtggaa tcccaagtga aacggaaagg 120
cccttactta ttaaataaaaa aaacatttga caatagaaaa ttgagaccaa tctgcataatg 180
aaacatcagg atccccacat ttcacaaatt ttacaagttt attaaggccct actctgtcca 240
tatggaactt ttctgcactt ccacgcacca acgaatatgc tgaaaattga ttttttagat 300
gtgtacgaat aaagcaatca aagaacgcgg ggcacacgac cgctggagac actgccattc 360
atgtgtgcct aacgtgtttt ctttagtcat tacgctccta ctaccgactc aatataatatt 420
aactatagta ttttttattt atgacgagaa acgtaatttt aatgttagat atatttaac 480
aagctatgat aattacatct tggccgta gtcataaaatg acacaaatatta aggtttgatt 540
ttcgtccact tctaagattt cttgttctaa tactagtata tttctgattt aaaaagttat 600
ttagtttttt ttgaatttgc tgataaaatgc caaaaactga aaattaaagt acttttaat 660
tttataaaaaaa taatatcatg gaaattaaaaa cgagaaaatta atgaaaaaagt agaagattgc 720
tttgcctataa tatagtgtt ctttcgtat tatttttatta agcgtaaaat tacataaaagg 780
tatccgtgct taaatttcta gcttgagagc atttttgaa gcaaaagttt cgataaaatca 840
agtttaata taaaattaca atcatcattt ctaattatata taattcttta aaaataaaaat 900
taaaaaaaaata tatacaataa ttgaagctcg gataaattaa aatatgtaac tattaaatata 960
tactcggata tattaaatata tattcgattt tattaaatatg tagctaaaaa tatattaaat 1020
aataataacaa atataatataat atatgtaaat catatacatt aaaaactatc taaaatataat 1080
aatatgcagc tgaatataat taacccagat acataaggcac ctcgagtaca taaaacaaat 1140
aaaagaattt aaaaataataa aaaataagtg aaagcaataa attgtatatt tctataattt 1200
atccctttat taatactaaa taaagttaga gaacctaaac aggaagcaca attatgacac 1260
gaggagagaa tagcgcgtca attgtgaccc tttacgcgga agtataatgtt ataaatagta 1320
gactctttt ctatatttgc atatcccata acaagagcag agatattcgt ttagcacaaa 1380
acaggcatac tattcaattc ctttcgttc cagaagc 1417

```

<210> 24
<211> 374
<212> DNA
<213> *Nicotiana tabacum*

```
<220>
<221> promoter
<222> (1)..(374)
<223> promoter of delta-0.3TobRB7
```

<400> 24
agcttatctaaacaaagttttaaattcatttcttaaacgtccattacaatgtataataac 60
tttagtcgtctcaattaaaccattaatgtaaatataaaatcaaaaaaaaagccaaaggcggt 120
gggacggcgcacaatcatttgccttagtccactcaaataaggccatggtcggcaaaacca 180
aacacaaaatgtgttatttttaatttttcctcttttattgttaaaagtttgcaaaatgtgt 240
tattttggtaagaccctatggatataaaagacaggttatgtgaaacttggaaaaccat 300
caagttttaagcaaaaccctcttagaacttaaattgagcttctttgggcattttct 360
agtgagaactaaaa 374

<210> 25
<211> 27
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 25
ggatccggta ccgttcagca atcaaat

<210> 26
<211> 23
<212> DNA
<213> KÜ

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 26
gtcgacgtct tgccaaaaac ctt 23

<210> 27
<211> 25
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 27
gtcgacctac gtgattaaat ttata 25

<210> 28
<211> 28
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 28
atcgaattca taatttaacc atcttagag 28

<210> 29
<211> 28
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 29
atcggtacct gcttctggaa cgaaaggg 28

<210> 30
<211> 34
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 30
ggaattcagc ttatctaaac aaagttttaa attc 34

<210> 31
<211> 30
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 31
gggttaccgt tctcactaga aaaatgcccc 30

<210> 32
<211> 461

<212> DNA
<213> Wheat dwarf virus
<220>
<221> promoter
<222> (1)..(461)
<223> V-sense promoter from Wheat Dwarf Virus
<400> 32
ccggcagggtc ctttagcgaaa aaacggggtg tgccagaaaa ctctatgctc taccctgcgt 60
ggaggtgtga attctgcaca ctgctaattgc aatgtgttcca atgctttata tagggcaggt 120
tttggcggga gaacagggcc cttgtgttcc cacgggagcg tagcgtatcg tgtggccct 180
gttcgggtgtg tggtcggggg gcctccacgc gggttataat attacccgc gtggggccc 240
ccgacgcgca ctccggcttt cgtgagtgcg cggaggctt tggaccacat cttttctgac 300
cacttcgtg gaatatgttgc atttatacaca cttttgacgc gaaatctgt gccatgcctt 360
agcttataag gaagtgcgtg gtagccatc tcgatggagc aggcaatagc ccccccgcctt 420
cctatacggg actatcaata ccagaccctt tccattcccg g 461
<210> 33
<211> 1173
<212> DNA
<213> Maize streak virus
<220>
<221> promoter
<222> (1)..(1173)
<223> V-sense promotor from Maize Streak Virus
<400> 33
aagcttattt gcagagtatt caaaatactg caattttgtg gaccaatcaa aggaaagctc 60
tttctggatc atggagaggt actcttcttt ggaagtagcg tggaaataa tgtctcgcat 120
tatttcatct ttagaaggct tttttcctt tacctctgaa tcagattttc cgaggaaggg 180
ggacttccta ggaatgaaag tacctctctc aaacacagcc agaggttcct tgagaatgta 240
atccctcacc ctgttactg acttggcact ctgaatattt gggtgaaacc catttatatc 300
aaagaacctt gagtcagata tccttaccgg cttctctgtc tgaagcaatg catgtaaatg 360
caaacttcca tctttatgtg cctctcgggc acatagaatg tatttggaa tccaaacgaac 420
aacgagctcc cagatcatct gacaggcgat ttcaggattt tctggacact ttggataggt 480
taggaacgtg ttagcgttcc ggtgtgagaa ctgacgggtt gatgaggagg aggccattgc 540
cgacgacgga ggttgaggct gagggatggc agactgggag ctccaaactc tatagtatac 600
ccgtgcgcct tcgcctcgag gcaaatccg ccgtccctt gtctttagt ggttgc当地 660
ggcccgacc gggccggccc agcaggaaaa gaaggcgcgc actaatatta ccgcgccttc 720
ttttcctcgc agggcccggt agggtcgacc ccgagcgtt tgatgtaaag ttggcctc 780
ctttgtatga tttatctaaa gcagccatt ctaaagaatc cggccccgt cactataat 840
tgcctaacaa gtgcgattca ttcatggatc cacagaacgc cctgtattat cagccgc当地 900
tacccacagc agctccgaca tccggaggag tgccgtggag tcgcgttaggc gaggtagcta 960
ttttgagctt tggcattt atttgcattt acctgctta ctttgggtg ctgagagacc 1020
ttatcttagt tctgaaggct cgacaaggca gatccacgga ggagctgata ttgggtggac 1080
aagctgtgaa taggagcaac cctatcccta atataccagc accaccaagt cagggcaatc 1140
ccggccatt tggccatcg actctagtcg acc 1173
<210> 34
<211> 353
<212> DNA
<213> Pepper huasteco virus
<220>
<221> promoter
<222> (1)..(353)
<223> V-sense promoter from Pepper huasteco virus
<400> 34
catatttgcataaagagagg tgtacaccga ttggagctct ttaacctggg cttattgtat 60
cggtgtattt gtagccaata tatagtatata gggagttatc taggatcttgc当地 120

gggcatccg ttataatatt accggatggc cgaccgccta ccttatctat ccgtactgct 180
 ttatttgaat taaaatgtt acttttatgc tatccaatga agcgtacgt ctggaaagct 240
 tagttatcatcg ttccagacgt ggggaccaag tagtgtatga ccacttatt gactgtcagc 300
 tttataaaatt gaaattaaaa cataagtggt ccatgtacct ttaattcaaa atg 353

<210> 35

<211> 1803

<212> DNA

<213> Serratia plymuthica

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1800)

<223> coding for sucrose isomerase

<400> 35

atg ccc cgt caa gga ttg aaa act gca cta gcg att ttt cta acc aca	48
Met Pro Arg Gln Gly Leu Lys Thr Ala Leu Ala Ile Phe Leu Thr Thr	
1 5 10 15	

tca tta agc gtc tca tgc cag caa gcc tta ggt acg caa caa ccc ttg	96
Ser Leu Ser Val Ser Cys Gln Gln Ala Leu Gly Thr Gln Gln Pro Leu	
20 25 30	

ctt aac gaa aag agt atc gaa cag tcg aaa acc ata cct aaa tgg tgg	144
Leu Asn Glu Lys Ser Ile Glu Gln Ser Lys Thr Ile Pro Lys Trp Trp	
35 40 45	

aag gag gct ttt tat cag gtg tat ccg cgt tcc ttt aaa gac act	192
Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr	
50 55 60	

aac ggg gat ggt atc ggg gat att aaa ggc atc ata gaa aaa tta gac	240
Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Ile Lys Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp	
65 70 75 80	

tat tta aaa gct ttg ggg att gat gcc att tgg atc aac cca cat tat	288
Tyr Leu Lys Ala Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr	
85 90 95	

gac tcc ccg aac acg gat aat ggt tac gat ata cgt gat tat cga aaa	336
Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys	
100 105 110	

atc atg aaa gaa tat ggc acg atg gag gat ttt gac cgc ctg att tct	384
Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser	
115 120 125	

gaa atg aaa aaa cgt aac atg cgg ttg atg att gat gtg gtc atc aac	432
Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn	
130 135 140	

cac acc agc gat caa aac gaa tgg ttt gtt aaa agt aaa agc agt aag	480
His Thr Ser Asp Gln Asn Glu Trp Phe Val Lys Ser Lys Ser Ser Lys	
145 150 155 160	

gat aat cct tat cgt ggc tat tac ttc tgg aaa gat gct aaa gaa ggg	528
Asp Asn Pro Tyr Arg Gly Tyr Phe Trp Lys Asp Ala Lys Glu Gly	
165 170 175	

cag gcg cct aat aat tac cct tca ttc ttt ggt ggc tcg gcg tgg caa	576
Gln Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln	
180 185 190	

aaa gat gaa aag acc aat caa tac tac ctg cac tat ttt gct aaa caa	624
Lys Asp Glu Lys Thr Asn Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln	
195 200 205	

cag cct gac cta aac tgg gat aac ccc aaa gtc cgt caa gat ctt tat	672
Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr	
210 215 220	
gca atg ttg cgt ttc tgg tta gat aaa ggc gtg tct ggt tta cgc ttt	720
Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe	
225 230 235 240	
gat acg gta gcg acc tac tca aaa att ccg gac ttc cca aat ctc acc	768
Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asp Phe Pro Asn Leu Thr	
245 250 255	
caa caa cag ctg aag aat ttt gca gct gag tat acc aag ggc cct aat	816
Gln Gln Leu Lys Asn Phe Ala Ala Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Asn	
260 265 270	
att cat cgt tac gtc aat gaa atg aat aga gaa gtt ttg tct cat tac	864
Ile His Arg Tyr Val Asn Glu Met Asn Arg Glu Val Leu Ser His Tyr	
275 280 285	
gac att gcc act gcc ggt gaa atc ttt ggc gta ccc ttg gat caa tcg	912
Asp Ile Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Gln Ser	
290 295 300	
ata aaa ttc ttc gat cgc cgt cgc gat gag ctg aac atc gca ttt acc	960
Ile Lys Phe Phe Asp Arg Arg Asp Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr	
305 310 315 320	
ttt gac tta atc aga ctc gat cga gac tct gat caa aga tgg cgt cga	1008
Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ser Asp Gln Arg Trp Arg Arg	
325 330 335	
aaa gag tgg aaa ttg tcg caa ttc cga cag gtc atc gat aac gtt gac	1056
Lys Glu Trp Lys Leu Ser Gln Phe Arg Gln Val Ile Asp Asn Val Asp	
340 345 350	
cgt act gcc ggc gaa tat ggt tgg aat gcc ttc ttc ttg gat aac cac	1104
Arg Thr Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His	
355 360 365	
gac aat ccg cgc gct gtc tcc cac ttt ggc gat gat cgc cca caa tgg	1152
Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp	
370 375 380	
cgc gag cca tcg gct aaa gcg ctt gca acc ttg acg ctg act caa cga	1200
Arg Glu Pro Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln Arg	
385 390 395 400	
gca acg cct ttt att tat caa ggt tca gaa ttg ggc atg acc aat tac	1248
Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr	
405 410 415	
ccc ttc aaa gct att gat gaa ttc gat gat att gag gtg aaa ggt ttt	1296
Pro Phe Lys Ala Ile Asp Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe	
420 425 430	
tgg cat gac tac gtt gag aca gga aag gtg aaa gcc gac gag ttc ttg	1344
Trp His Asp Tyr Val Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala Asp Glu Phe Leu	
435 440 445	
caa aat gta cgc ctg acg agc agg gat aac agc cgg aca ccg ttc caa	1392
Gln Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln	
450 455 460	
tgg gat acg agc aaa aat gca gga ttc acg agc gga aaa cct tgg ttc	1440
Trp Asp Thr Ser Lys Asn Ala Gly Phe Thr Ser Gly Lys Pro Trp Phe	
465 470 475 480	

aag gtc aat cca aac tac cag gaa atc aat gcg gta agt caa gtc gca	1488
Lys Val Asn Pro Asn Tyr Gln Glu Ile Asn Ala Val Ser Gln Val Ala	
485	490
495	
cag ccc gac tcg gta ttt aat tat tat cgt cag ttg atc aag ata agg	1536
Gln Pro Asp Ser Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Gln Leu Ile Lys Ile Arg	
500	505
510	
cat aac atc ccg gca ctg acc tat ggc aca tac acc gat ttg gat cct	1584
His Asn Ile Pro Ala Leu Thr Tyr Gly Thr Tyr Thr Asp Leu Asp Pro	
515	520
525	
gca aat gat tcg gtc tac gcc tat aca cgc agc ctt ggg gcg gaa aaa	1632
Ala Asn Asp Ser Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Ser Leu Gly Ala Glu Lys	
530	535
540	
tat ctt gtt gtc gtt aac ttc cag gaa caa gtg atg aga tat aaa tta	1680
Tyr Leu Val Val Val Asn Phe Gln Glu Gln Val Met Arg Tyr Lys Leu	
545	550
555	560
ccg gat aat cta tcc atc gag aaa gtg att ata gaa agc aac agc aaa	1728
Pro Asp Asn Leu Ser Ile Glu Lys Val Ile Ile Glu Ser Asn Ser Lys	
565	570
575	
aac gtt gtg aaa aag aat gat tcc tta ctc gaa cta aaa cca tgg cag	1776
Asn Val Val Lys Lys Asn Asp Ser Leu Leu Glu Leu Lys Pro Trp Gln	
580	585
590	
tca ggg gtt tat aaa cta aat caa taa	1803
Ser Gly Val Tyr Lys Leu Asn Gln	
595	600
<210> 36	
<211> 600	
<212> PRT	
<213> Serratia plymuthica	
<400> 36	
Met Pro Arg Gln Gly Leu Lys Thr Ala Leu Ala Ile Phe Leu Thr Thr	
1	5
10	15
Ser Leu Ser Val Ser Cys Gln Gln Ala Leu Gly Thr Gln Gln Pro Leu	
20	25
30	
Leu Asn Glu Lys Ser Ile Glu Gln Ser Lys Thr Ile Pro Lys Trp Trp	
35	40
45	
Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr	
50	55
60	
Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Ile Lys Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp	
65	70
75	80
Tyr Leu Lys Ala Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr	
85	90
95	
Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys	
100	105
110	
Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser	
115	120
125	
Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn	
130	135
140	
His Thr Ser Asp Gln Asn Glu Trp Phe Val Lys Ser Lys Ser Ser Lys	
145	150
155	160
Asp Asn Pro Tyr Arg Gly Tyr Tyr Phe Trp Lys Asp Ala Lys Glu Gly	
165	170
175	

Gln Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln
 180 185 190
 Lys Asp Glu Lys Thr Asn Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln
 195 200 205
 Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr
 210 215 220
 Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe
 225 230 235 240
 Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asp Phe Pro Asn Leu Thr
 245 250 255
 Gln Gln Leu Lys Asn Phe Ala Ala Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Asn
 260 265 270
 Ile His Arg Tyr Val Asn Glu Met Asn Arg Glu Val Leu Ser His Tyr
 275 280 285
 Asp Ile Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Gln Ser
 290 295 300
 Ile Lys Phe Phe Asp Arg Arg Asp Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr
 305 310 315 320
 Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ser Asp Gln Arg Trp Arg Arg
 325 330 335
 Lys Glu Trp Lys Leu Ser Gln Phe Arg Gln Val Ile Asp Asn Val Asp
 340 345 350
 Arg Thr Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His
 355 360 365
 Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp
 370 375 380
 Arg Glu Pro Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln Arg
 385 390 395 400
 Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr
 405 410 415
 Pro Phe Lys Ala Ile Asp Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe
 420 425 430
 Trp His Asp Tyr Val Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala Asp Glu Phe Leu
 435 440 445
 Gln Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln
 450 455 460
 Trp Asp Thr Ser Lys Asn Ala Gly Phe Thr Ser Gly Lys Pro Trp Phe
 465 470 475 480
 Lys Val Asn Pro Asn Tyr Gln Glu Ile Asn Ala Val Ser Gln Val Ala
 485 490 495
 Gln Pro Asp Ser Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Gln Leu Ile Lys Ile Arg
 500 505 510
 His Asn Ile Pro Ala Leu Thr Tyr Gly Thr Tyr Thr Asp Leu Asp Pro
 515 520 525
 Ala Asn Asp Ser Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Ser Leu Gly Ala Glu Lys
 530 535 540
 Tyr Leu Val Val Val Asn Phe Gln Glu Gln Val Met Arg Tyr Lys Leu
 545 550 555 560

50

Pro Asp Asn Leu Ser Ile Glu Lys Val Ile Ile Glu Ser Asn Ser Lys
565 570 575

Asn Val Val Lys Lys Asn Asp Ser Leu Leu Glu Leu Lys Pro Trp Gln
580 585 590

Ser Gly Val Tyr Lys Leu Asn Gln
595 600

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/0227

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 C12N9/90 C12N15/82

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02 27003 A (KUNZ MARKWART ;MATTES RALF (DE); SUEDZUCKER AG (DE); VOGEL MANFRED) 4 April 2002 (2002-04-04) page 14, line 5 - line 13 ---	8,9, 11-15
X	BOERNKE FREDERIK ET AL: "Potato tubers as bioreactors for palatinose production" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 96, no. 1, 13 June 2002 (2002-06-13), pages 119-124, XP002259504 ISSN: 0168-1656 the whole document ---	8,9, 11-15
X	WO 01 59136 A (IPK INST FUER PFLANZENGENETIK ;SONNEWALD UWE (DE); BOERNKE FREDERIK) 16 August 2001 (2001-08-16) example 6 ---	8,9, 11-15
-/-		

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the International filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the Invention
- *X* document of particular relevance; the claimed Invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed Invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

28 October 2003

Date of mailing of the International search report

13/11/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kania, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03 027

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 95 20047 A (KLEIN KATHRIN ;KUNZ MARKWART (DE); MATTES RALF (DE); SUEDZUCKER AG) 27 July 1995 (1995-07-27) ----	
A	WO 01 59135 A (IPK INST FUER PFLANZENGENETIK ;SONNEWALD UWE (DE); BOERNKE FREDERI) 16 August 2001 (2001-08-16) ----	
A	ROCHA-SOSA M ET AL: "BOTH DEVELOPMENTAL AND METABOLIC SIGNALS ACTIVATE THE PROMOTER OF A CLASS I PATATIN GENE" EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 8, no. 1, 1989, pages 23-29, XP002038303 ISSN: 0261-4189 page 28, left-hand column, last paragraph -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/0227

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0227003	A 04-04-2002	DE 10047286 A1 AU 7639801 A CA 2421618 A1 WO 0227003 A1 EP 1322772 A1	04-04-2002 08-04-2002 19-03-2003 04-04-2002 02-07-2003
WO 0159136	A 16-08-2001	DE 10006462 A1 AU 3547401 A WO 0159136 A1 EP 1272645 A1	13-09-2001 20-08-2001 16-08-2001 08-01-2003
WO 9520047	A 27-07-1995	DE 4414185 C1 AU 1155495 A AU 688848 B2 AU 1534995 A BR 9500271 A CA 2140613 A1 DE 4447471 A1 DE 4447472 A1 WO 9520047 A2 EP 0740706 A1 FI 950187 A FI 962891 A JP 7250693 A NO 950194 A US 2003087416 A1 US 5786140 A US 5985622 A	07-09-1995 27-07-1995 19-03-1998 08-08-1995 17-10-1995 20-07-1995 31-08-1995 14-09-1995 27-07-1995 06-11-1996 20-07-1995 18-07-1996 03-10-1995 20-07-1995 08-05-2003 28-07-1998 16-11-1999
WO 0159135	A 16-08-2001	DE 10045113 A1 AU 3546001 A WO 0159135 A1 EP 1263971 A1 US 2003159181 A1	16-08-2001 20-08-2001 16-08-2001 11-12-2002 21-08-2003

INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/0227

A. Klassifizierung des Anmeldungsgegenstandes
IPK 7 C12N9/90 C12N15/82

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprästoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
X	WO 02 27003 A (KUNZ MARKWART ;MATTES RALF (DE); SUEDZUCKER AG (DE); VOGEL MANFRED) 4. April 2002 (2002-04-04) Seite 14, Zeile 5 - Zeile 13 ---	8,9, 11-15
X	BOERNKE FREDERIK ET AL: "Potato tubers as bioreactors for palatinose production" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, Bd. 96, Nr. 1, 13. Juni 2002 (2002-06-13), Seiten 119-124, XP002259504 ISSN: 0168-1656 das ganze Dokument ---	8,9, 11-15
X	WO 01 59136 A (IPK INST FUER PFLANZENGENETIK ;SONNEWALD UWE (DE); BOERNKE FREDERIK) 16. August 2001 (2001-08-16) Beispiel 6 ---	8,9, 11-15
-/-		

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem Internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kolidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche	Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts
28. Oktober 2003	13/11/2003
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Kania, T

INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03 0227

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 95 20047 A (KLEIN KATHRIN ;KUNZ MARKWART (DE); MATTES RALF (DE); SUEDZUCKER AG) 27. Juli 1995 (1995-07-27) ---	
A	WO 01 59135 A (IPK INST FUER PFLANZENGENETIK ;SONNEWALD UWE (DE); BOERNKE FREDERI) 16. August 2001 (2001-08-16) ---	
A	ROCHA-SOSA M ET AL: "BOTH DEVELOPMENTAL AND METABOLIC SIGNALS ACTIVATE THE PROMOTER OF A CLASS I PATATIN GENE" EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 8, Nr. 1, 1989, Seiten 23-29, XP002038303 ISSN: 0261-4189 Seite 28, linke Spalte, letzter Absatz -----	

INTERNATIONALER ~~RE~~CHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationale Aktenzeichen

PCT/EP 05027

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0227003	A	04-04-2002	DE 10047286 A1 AU 7639801 A CA 2421618 A1 WO 0227003 A1 EP 1322772 A1	04-04-2002 08-04-2002 19-03-2003 04-04-2002 02-07-2003
WO 0159136	A	16-08-2001	DE 10006462 A1 AU 3547401 A WO 0159136 A1 EP 1272645 A1	13-09-2001 20-08-2001 16-08-2001 08-01-2003
WO 9520047	A	27-07-1995	DE 4414185 C1 AU 1155495 A AU 688848 B2 AU 1534995 A BR 9500271 A CA 2140613 A1 DE 4447471 A1 DE 4447472 A1 WO 9520047 A2 EP 0740706 A1 FI 950187 A FI 962891 A JP 7250693 A NO 950194 A US 2003087416 A1 US 5786140 A US 5985622 A	07-09-1995 27-07-1995 19-03-1998 08-08-1995 17-10-1995 20-07-1995 31-08-1995 14-09-1995 27-07-1995 06-11-1996 20-07-1995 18-07-1996 03-10-1995 20-07-1995 08-05-2003 28-07-1998 16-11-1999
WO 0159135	A	16-08-2001	DE 10045113 A1 AU 3546001 A WO 0159135 A1 EP 1263971 A1 US 2003159181 A1	16-08-2001 20-08-2001 16-08-2001 11-12-2002 21-08-2003

Verfahren zum Erreichen einer Pathogenresistenz in Pflanzen

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung einer Pathogenresistenz in Pflanzen durch - bevorzugt pathogeninduzierbare - Expression einer Saccharoseisomerase.

10 Palatinose (Isomaltulose) und Trehalulose werden großtechnisch aus Saccharose durch eine enzymatische Umlagerung unter Verwendung von immobilisierten Bakterienzellen hergestellt. Dabei wird die zwischen den Monosacchariden des Disaccharids Saccharose bestehende ($\alpha 1 \rightarrow \beta 2$ -glykosidische Bindung zu einer $\alpha 1 \rightarrow \alpha 6$ -Bindung

15 bei Palatinose bzw. einer $\alpha 1 \rightarrow \alpha 1$ -Bindung bei Trehalulose isomertisiert. Diese Umlagerung von Saccharose zu den beiden nicht-kariogenen Disacchariden erfolgt unter Katalyse des bakteriellen Enzyms Saccharoseisomerase, auch Saccharosemutase genannt. Entsprechende Sequenzen sind beispielsweise in WO 95/20047

20 (US 5,786,140; US 5,985,622) beschrieben.

Ferner sind beschrieben Saccharoseisomerasen aus *Erwinia rhabontici* (pall Gen, GenBank Acc.-No.: AF279281; Börnke et al. (2001) J Bacteriol 183(8):2425-2430) und *Klebsiella* sp. Strain 25 LX3 (GenBank Acc.-No.: AY040843; Zhang et al. (2002) Appl Environ Microbiol (68):2676-2682).

WO 01/59136 beschreibt Verfahren zur direkten Herstellung nicht-kariogener Zucker direkt in transgenen Pflanzen, die rekombinante Nukleinsäuremoleküle kodierend für Proteine mit der enzymatischen Aktivität einer Saccharoseisomerase enthalten. Beschrieben sind Expressionskonstrukte für besagte Saccharoseisomerase zur Expression in Pflanzen, sowie die mit denselben transformierten transgenen Pflanzen.

35 WO 01/59135 beschreibt Verfahren zur Beeinflussung der Pollenentwicklung unter Verwendung von antheren-, tapetum oder pollenspezifisch exprimierten Saccharoseisomerasen. Die konstitutive Expression der Saccharoseisomerase in Pflanzen hat jedoch nachteilige Wirkung auf das Wachstum der Pflanze (Börnke F et al. (2002) Planta 214:356-364).

Ziel biotechnologischer Arbeiten an Pflanzen ist die Herstellung von Pflanzen mit vorteilhaften, neuen Eigenschaften zum Beispiel zur Steigerung der landwirtschaftlichen Produktivität, zur Qualitätssteigerung bei Nahrungsmitteln oder zur Produktion bestimmter Chemikalien oder Pharmazeutika. Oft sind die natürlichen Abwehr-

mechanismen der Pflanze gegen Pathogene unzureichend. Allein Pilzerkrankungen führen zu Ernteverlusten in der Höhe von vielen Milliarden US-\$ jährlich. Die Einführung fremder Gene aus Pflanzen, Tieren oder mikrobiellen Quellen kann die Abwehr verstärken.

5 Beispiele sind der Schutz gegen Insektenfrass in Tabak durch Expression von *Bacillus thuringiensis* Endotoxinen unter Kontrolle des 35 S CaMV Promoters (Vaeck et al. (1987) *Nature* 328:33-37) oder der Schutz des Tabaks gegen Pilzbefall durch Expression einer Chitinase aus der Bohne unter Kontrolle des CaMV Promoters

10 (Broglie et al. (1991) *Science* 254:1194-1197). Die meisten der beschriebenen Ansätze gewähren jedoch nur eine Resistenz gegen ein einzelnes Pathogen oder gegen ein schmales Spektrum von Pathogenen.

15 Es gibt nur wenige Ansätze, die Pflanzen eine Resistenz gegen ein breiteres Spektrum von Pathogenen, vor allem Pilzpathogene, verleihen. Die systemische erworbene Resistenz ("systemic acquired resistance"; SAR) - ein Abwehrmechanismus bei verschiedenen Pflanze/Pathogen-Interaktionen - kann durch Applikation von endogenen Botenstoffen wie Jasmonsäure (JA) oder Salicylsäure (SA) vermittelt werden (Ward, et al. (1991) *Plant Cell* 3:1085-1094; Uknes, et al. (1992) *Plant Cell* 4(6):645-656). Ähnliche Effekte können auch durch synthetische Verbindungen wie 2,6-Dichlorisonikotinsäure (INA) oder Benzo(1,2,3)thiadiazol-7-thiocarbonsäure-25 S-methylester (BTH; Bion®) (Friedrich et al. (1996) *Plant J* 10(1):61-70; Lawton et al. (1996) *Plant J.* 10:71-82) bewirkt werden. Auch die Expression der im Rahmen eines SAR hochregulierten "pathogenesis related" (PR) Proteine vermag zum Teil eine Pathogenresistenz zu bewirken.

30 In Gerste ist bereits seit längerem der Mlo-Locus als negativer Regulator der Pathogenabwehr beschrieben. Der Verlust oder Funktionsverlust ("loss-of-function") des Mlo-Gens bedingt eine erhöhte und vor allem rassen-unspezifische Resistenz beispielweise gegen zahlreiche Arten von Mehltau (Büschgess R et al. (1997) *Cell* 88:695-705; Jorgensen JH (1977) *Euphytica* 26:55-62; Lyngkjaer MF et al. (1995) *Plant Pathol* 44:786-790). Das Mlo-Gen wurde erst kürzlich kloniert (Büschgess R et al. (1997) *Cell* :695-705; WO 98/04586; Schulze-Lefert P, Vogel J (2000) *Trends Plant Sci.* 5:343-348). Verschiedene Verfahren unter Verwendung von Mlo-Genen zum Erzielen einer Pathogenresistenz sind beschrieben (WO 98/04586; WO 00/01722; WO 99/47552). Unklar ist, ob ein Mlo-basierter Ansatz auch in dikotyledonen Pflanzen praktikabel ist.

45

Generell leben pflanzenpathogene Pilzarten saprophytisch oder parasitisch. Letztere sind - zumindest in bestimmten Phasen ihres Lebenszyklus - auf ein Wirkstoffangebot (z.B. ein Angebot an Vitaminen, Kohlenhydraten usw.) angewiesen, wie es in dieser Form 5 nur von lebenden Pflanzenzellen bereitgestellt werden kann. Der Fachmann unterscheidet parasitäre Pilze in nekrotrophe, hemibiotrophe und biotrophe. Bei nekrotrophen pilzlichen Parasiten führt die Infektion zur Gewebezerstörung und damit zum Tod der Pflanze. Diese Pilze sind meist nur fakultativ parasitär; sie können sich 10 ebenso gut saprophytisch in totem oder absterbendem Pflanzenmaterial vermehren.

Biotrophe pilzliche Parasiten sind dadurch charakterisiert, dass Parasit und Wirt, zumindest über längere Zeiträume hinweg, 15 zusammenleben. Der Pilz entnimmt dem Wirt Nährstoffe, tötet ihn jedoch nicht ab. Die meisten biotrophen Pilze sind obligate Parasiten. Hemibiotrophe Pilze leben zeitweise biotroph und töten den Wirt zu einem späteren Zeitpunkt ab, d.h. sie wechseln in eine nekrotrophe Phase.

20 Einer weitere große Gruppe biotropher pflanzlicher Pathogene von enormer agro-ökonomischer Bedeutung stellen Nematoden dar. Pflanzenpathogene Nematoden entnehmen ihre Nahrung aus den äußeren pflanzlichen Gewebeabschnitten (Ektoparasiten) oder nach 25 dem Eindringen in die Pflanze aus tiefer liegenden Zellschichten (Endoparasiten). Bei den endoparasitären Wurzelnematoden unterscheidet man nach ihrer Lebens- und Ernährungsweisen zwischen zwei Gruppen: Zystenbildende Nematoden (Heterodera- und Globodera-Arten) und Wurzelgallennematoden (Meloidogyne-Arten). Bei 30 beiden Gruppen handelt es sich um obligate biotrophe Parasiten, die in den Wurzeln die Bildung spezieller Nährzellen induzieren. Bei diesen Nährzellen handelt es sich um Pflanzenzellen, deren Stoffwechsel von den Nematoden so verändert wurde, dass sie gezielt der Ernährung der sich entwickelten Nematoden dienen. Endo- 35 parasitäre Wurzelnematoden sind in ihrer Entwicklung von diesen Nährzellen absolut abhängig (zur Übersicht siehe Sijmons et al. (1994) Ann. Rev. Phytopathol. 32: 235-259). Zystenbildende Nematoden (Heterodera- und Globodera-Arten) verbleiben an der Parasitierungsstelle in der Wurzel (sessile Endoparasiten) 40 wandeln die sie umgebenden Zellen durch Protoplastenfusion bei teilweiser Zellwandauflösung in Syncytien um. Diesen Nährzellen, die im Zentralzylinder der Wurzel gebildet werden, entnehmen die Nematoden ihre Nahrung und schwollen dabei stark an. Wurzelgallennematoden (Meloidogyne-Arten) verbleiben ebenfalls an der 45 einmal gewählten Parasitierungsstelle und veranlassen die Bildung von Nährzellen, welche aber, anders als bei den Zystenbildenden Nematoden aus mehreren, durch synchrone Kernteilungen ohne Zell-

wandbildung sich entwickelnden vielkernigen Riesenzellen bestehen (Fenoll and Del Campo (1998) *Physiol. Mol. Biol. Plants* 4:9-18). Die Bildung der Nährzellensysteme wird durch die Signalmoleküle im Speichel der Nematoden induziert. Es ist bekannt, dass während 5 dieser Differenzierungsprozesse eine Reihe von Pflanzengenen ihr Expressionsprofil stark verändern. In der Literatur sind Promotoren beschrieben, die speziell in Nährzellsystem (Syncytien) induziert werden. Beispielhaft seien zu nennen der $\Delta 0.3$ TobRB7 Promotor aus Tabak (Opperman et al. (1994) *Science* 263:221-223, 10 der Lemmi9 Promotor aus Tomate (Ecobar et al. (1999) *Mol Plant Microbe Interact* 12: 440-449), sowie Geminivirus V-sense Promotoren (WO 00/01832).

WO 94/10320 beschreibt DNA Konstrukte zur Expression von Genen, 15 die als Inhibitoren endogener Pflanzengene wirken (z.B. ATP Synthase, Cytochrom C, Pyruvatkinase), unter der Kontrolle von Nematoden-induzierter Promotoren in den Syncytien.

Trotz einiger Fortschritte in manchen Bereichen der Pflanzen- 20 biotechnologie, sind die Erfolge beim Erzielen einer Pathogenresistenz in Pflanzen sehr begrenzt und bislang nur gegen Viren hinreichend belegt. Insbesondere Ernteverluste infolge von Pilz- und Nematodenbefall stellen ein ernstzunehmendes Problem dar und erfordern nach wie vor den intensiven Einsatz von Fungiziden und 25 Nematoziden. Dennoch sind die damit zusammenhängenden Probleme nur unzureichend in den Griff zu bekommen.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, neue Verfahren zur Pathogenabwehr in Pflanzen bereitzustellen, die eine 30 effiziente Abwehr eines möglichst breiten Spektrums von Pathogenen, bevorzugt von Pilzen und Nematoden, in möglichst vielen verschiedenen Pflanzenarten, bevorzugt den in der Landwirtschaft verwendeten Kulturpflanzen bewirken. Diese Aufgabe wird durch das erfindungsgemäße Verfahren gelöst.

35

Ein erster Gegenstand der Erfindung umfasst ein Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung der Resistenz gegen mindestens ein Pathogen in pflanzlichen Organismen, wobei nachfolgende Arbeitsschritte umfasst sind

40

a) transgene Expression eines Proteins mit Saccharoseisomerase Aktivität in einem pflanzlichen Organismus oder einem Gewebe, Organ, Teil oder Zelle desselben, und

45

5

b) Auswahl der pflanzlichen Organismen, bei denen - im Unterschied oder Vergleich zur Ausgangsorganismus - die Resistenz gegen mindestens ein Pathogen besteht oder erhöht ist.

5 Das erfindungsgemäße Verfahren kann im Prinzip auf alle pflanzlichen Organismen angewendet werden, die Saccharose produzieren. Dazu zählen alle höheren Pflanzen. Es wurde überraschender Weise beobachtet, dass auf Kartoffelscheiben transgener Kartoffelpflanzen, in deren Knollen aufgrund transgener Expression einer 10 Saccharoseisomerase Saccharose in Palatinose umgewandelt wird, das Wachstum des Pilzes *Alternaria* signifikant gehemmt ist.

Ferner kann beobachtet werden, dass die transgene Expression der Saccharoseisomerase auch eine Resistenz gegen Nematoden bewirkt.

15 Insbesondere eine durch endoparasitären Wurzelnematoden hervorgerufene Syncitien-spezifische Expression der Saccharoseisomerase-sequenz bewirkt eine deutliche Reduktion des Nematodenbefalls.

Da zahlreiche Pathogene, insbesondere Pilze und Nematoden, Palatinose nicht verstoffwechseln können, ist eine Überwindung der Resistenz durch einfache Mutation in den Pathogenen kaum möglich, da hierfür die Gewinnung einer neuen Enzymaktivität erforderlich wäre.

25 "Protein mit Saccharoseisomerase Aktivität" meint im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Protein, das als "wesentliche Eigenschaft" die Isomerisierung von Saccharose zu anderen Disacchariden katalysiert, wobei die $\alpha 1 \rightarrow \beta 2$ -glykosidische Bindung zwischen Glukose und Fruktose in der Saccharose in eine andere 30 glykosidische Bindung zwischen zwei Monosaccharideinheiten überführt wird, insbesondere in eine $\alpha 1 \rightarrow \alpha 6$ -Bindung und/oder einer $\alpha 1 \rightarrow \alpha 1$ -Bindung.

Eine Saccharoseisomerase-Aktivität kann indirekt über die 35 Analyse der resultierenden Kohlenhydrate (z.B. Palatinosegehalt) in der dem Fachmann geläufigen Weise beispielsweise durch Analyse ethanolischer Extrakte entsprechenden biologischen Materials (z.B. Material einer transgenen Pflanze oder eines Mikroorganismus) gemessen werden. Besagte Extrakte können z.B. 40 durch HPLC analysiert und die Zucker anhand der entsprechenden Standards identifiziert werden. Ein Verfahren zur Analyse ist z.B. in WO 01/59136 beschrieben. So werden zum Nachweis von Saccharoseisomerase-Aktivität in Pflanzenextrakten Blattscheiben mit einem Durchmesser von ca. 0,8 cm für 2 h bei 70°C mit 100 μ l 45 80 % Ethanol und 10 mM HEPES-Puffer (pH 7,5) extrahiert. Für die Analyse eines Aliquots dieser Extrakte kann ein HPLC-System z.B. der Firma Dionex verwendet werden, welches mit einer PA-1 (4 x

250 mm)-Säule und einen gepulsten elektrochemischen Detektor ausgestattet werden kann. Vor der Injektion können die Proben für 2 Minuten bei 13.000 rpm abzentrifugiert werden. Die Zucker können anschließend mit einem 10 minütigen Gradienten von 0 bis 1 5 M Natriumacetat nach 4 Minuten bei 150 mM NaOH und einer Durchflussrate von 1 ml/min eluiert werden. Zur Identifizierung und Quantifizierung der Zucker können die entsprechenden Standards der Firma Sigma verwendet werden.

10 Besonders bevorzugt wird unter einem Protein mit Saccharose-isomerase Aktivität ein Protein verstanden, das als wesentliche Eigenschaft zur Isomerisierung von Saccharose zu Palatinose und/oder Trehalulose befähigt ist. Dabei beträgt der Anteil von Palatinose und Trehalulose an den gesamten Disacchariden, die 15 durch Isomerisierung von Saccharose gebildet werden mindestens 2 %, bevorzugt mindestens 20 %, besonders bevorzugt mindestens 50 % und am meisten bevorzugt mindestens 60 %.

Die Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Protein mit Saccharose-isomerase-Aktivität, kann aus natürlichen Quellen isoliert oder 20 nach herkömmlichen Verfahren synthetisiert werden.

Beispiele für Organismen, deren Zellen Proteine mit Saccharose-isomerase-Aktivität sowie die dafür kodierende Nukleinsäure-sequenzen enthalten, sind insbesondere Mikroorganismen der 25 Gattungen *Protaminobacter*, *Erwinia*, *Serratia*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Klebsiella* und *Enterobacter*. Insbesondere sind hier folgende Beispiele für solche Mikroorganismen zu nennen:

30 *Protaminobacter rubrum* (CBS 547, 77), *Erwinia rhabontici* (NCPPB 1578), *Serratia plymuthica* (ATCC 15928), *Serratia marcescens* (NCIB 8285), *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-52 If (ATCC 1083 0a). *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45 (FERM 11808 bzw. FERM BP 3619), *Agrobacterium radiobacter* MX-232 (FERM 12397 bzw. FERM BP 35 3620), *Klebsiella* subspezies und *Enterobacter* spezies.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Nukleinsäure-ssequenz kodierend für ein Protein mit einer Saccharose-isomerase-Aktivität, Nukleinsäuresequenzen, die für Proteine 40 mit Saccharoseisomerase-Aktivität kodieren, wobei die Nuklein-säuren ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus

i) Nukleinsäuresequenzen kodierend ein Protein gemäß SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 oder 36 und

- ii) Nukleinsäuresequenzen kodierend ein funktionelles Äquivalent zu einem Protein gemäß SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 oder 36 und
- 5 iii) Nukleinsäuresequenzen kodierend für funktionell äquivalente Fragmente zu einem Protein gemäß i) und ii).

Weitere Nukleinsäuresequenzen, die für Proteine mit Saccharoseisomerase-Aktivität kodieren, sind im Stand der Technik bekannt und stehen dem Fachmann somit für den Transfer auf Pflanzenzellen zur Verfügung. So sind z.B. Sequenzen aus *Protaminobacter rubrum*, *Erwinia rhabontici*, *Enterobacter species SZ 62* und *Pseudomonas mesoacidophila MX-45* in WO 95/20047 beschrieben. Auf die Offenbarung dieser Patentanmeldung wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen, sowohl hinsichtlich der offenbarten Sequenzen selbst, als auch im Hinblick auf die Auffindung und Charakterisierung dieser und weiterer Saccharoseisomerase kodierender Sequenzen aus anderen Quellen.

20 Weitere für Saccharoseisomerasen kodierende DNA-Sequenzen kann der Fachmann u.a. den Gendatenbanken unter Verwendung geeigneter Suchprofile und Computerprogramme für das Durchmustern nach homologen Sequenzen bzw. für Sequenzvergleiche entnehmen. Darüber hinaus kann der Fachmann weitere Saccharoseisomerase kodierende 25 Nukleinsäuresequenzen aus anderen Organismen mittels herkömmlicher molekularbiologischer Techniken selbst auffinden und im Rahmen der vorliegenden Erfindung einsetzen. So kann der Fachmann z.B. geeignete Hybridisierungssonden von den bekannten Saccharoseisomerase-Sequenzen ableiten und für das Durchmustern 30 von cDNA- und/oder genomischen Banken des jeweils gewünschten Organismus, aus dem ein neues Saccharoseisomerase-Gen isoliert werden soll, einsetzen. Hierbei kann der Fachmann auf geläufige Hybridisierungs-, Klonierungs- und Sequenzierungsmethoden zurückgreifen (siehe z.B. Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: 35 A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York). Ebenso ist der Fachmann in der Lage, anhand bekannter Saccharoseisomerase-DNA-Sequenzen geeignete - gegebenenfalls degenerierte - Oligonukleotide als Primer für Klonierungen neuer Gene mittels PCR zu synthetisieren 40 und erfolgreich einzusetzen.

Proteine mit Saccharoseisomerase Aktivität sowie die dafür kodierenden Nukleinsäuresequenzen kann der Fachmann in der ihm geläufigen Weise unschwer aus solchen Organismen isolieren, in 45 denen solche Aktivitäten detektiert wurden. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (z.B. DE 44 14 185). So kann z.B. durch partiellen Verdau von genomischer DNA eines solchen Organismus

(bevorzugt eines Mikroorganismus) und Einbringen der erhaltenen Fragmente in geeignete E.coli-Vektoren und Transformation einer Genbank gewonnen werden, deren Klone genomische Abschnitte zwischen 2 und 15 kb des Spenderorganismus enthalten. Aus E.coli-Zellen, die diese Plasmide tragen, werden durch Plattierung auf McConkey-Palatinosemedium solche ausgewählt, die eine Rotfärbung der Kolonie aufweisen. Die in diesen Zellen enthaltene Plasmid-DNA wird in eine E.coli-Mutante überführt, die auf Galactose als einziger C-Quelle nicht wachsen kann (z.B. ED 8654, Sambrook et al., supra, Seiten A9-A13). Diese transformierte Zelllinie ist zur Identifikation von Palatinoseproduzenten in der wie oben beschrieben hergestellten Genbank aus DNA des Spenderorganismus in der Lage. Zur Identifikation der gesuchten Palatinose-bildenden Klone werden die Zellen der Genbank auf Minimal-Salzmedien mit Galactose und Saccharose vereinzelt und angezogen. Nach Replika-Stempeln der Kolonien auf Platten mit dem gleichen Medium werden die Zellen durch Bedämpfung mit Toluol abgetötet. Anschließend werden Zellen des Screeningstamms als Rasen in Minimalsalz-Weichagar ohne C-Quellenzusatz über die Kolonien der Genbank ausgebracht und bebrütet. Es entsteht signifikantes Wachstum der Zellen des Screeningstamms nur am Ort von Zellen der Genbank, die Palatinose produziert haben. Bei Prüfung der Zellen der Replikakontrolle ergibt sich der Gehalt an Isomerase. Diese so identifizierten E.coli-Klone sind auf Palatinose als einziger C-Quelle im Medium nicht wachstumsfähig, zeigen im Test der ganzen Zellen oder in Zellextrakten keine Fähigkeit zur Spaltung von Saccharose, bilden aber unter diesen Bedingungen und ohne Zusatz von Saccharose zum Medium bei der Anzucht Palatinose.

Alternativ können Isomerase-Klone auch unter Verwendung eines PCR-Fragments identifiziert werden. Verwendet man Plasmid-DNA den so identifizierten E.coli-Klonen als Sonden zur Hybridisierung an Filtern mit immobilisierter DNA aus dem Spenderorganismus, lassen sich die Gembereiche, die Isomerase-gene tragen, nachweisen und gezielt verfügbar machen.

Funktionelle Äquivalente der im Rahmen dieser Erfindung offensichtlichen Proteine mit Saccharoseisomerase-Aktivität umfassen bevorzugt solche aus anderen Organismen, beispielsweise aus Mikroorganismen, deren genomische Sequenz ganz oder teilweise bekannt ist, wie beispielsweise aus Mikroorganismen der Gattungen *Protaminobacter*, *Erwinia*, *Serratia*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Klebsiella* und *Enterobacter*. Diese können z.B. durch Datenbanksuche in Sequenzdatenbanken wie GenBank oder Durchmustern von Gen- oder cDNA-Banken - z.B. unter Verwendung der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 oder eines Teils derselben als

Suchsequenz bzw. Sonde - aufgefunden werden. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Aminosäurerreste.

5 So kann der Fachmann, falls erwünscht, zusätzlich mittels Routinetechniken, verschiedenartige Mutationen in die die Saccharoseisomerase kodierende DNA-Sequenz einführen, wodurch es zur Synthese von Proteinen mit eventuell veränderten biologischen Eigenschaften kommt. So ist es z.B. möglich, gezielt
10 Enzyme herzustellen, die durch Addition entsprechender Signalsequenzen in bestimmten Kompartimenten der Pflanzenzelle lokalisiert sind. Derartige Sequenzen sind in der Literatur beschrieben und dem Fachmann bekannt (siehe z.B. Braun et al. (1992) EMBO J 11:3219-3227; Wolter F et al. (1988) Proc Natl Acad
15 Sci USA 85:846-850; Sonnewald U et al. (1991) Plant J 1:95-106).

Weiterhin ist auch die Einführung von Punktmutationen an Positionen denkbar, bei denen eine Veränderung der Aminosäuresequenz einen Einfluss beispielsweise auf die Enzymaktivität
20 oder die Regulierung des Enzyms hat. Auf diese Weise können z.B. Mutanten hergestellt werden, die nicht mehr den normalerweise in der Zelle herrschenden Regulationsmechanismen über allosterische Regulation oder kovalente Modifizierung unterliegen. Des weiteren können Mutanten hergestellt werden, die eine veränderte Substrat-
25 oder Produktspezifität aufweisen. Weiterhin können Mutanten hergestellt werden, die ein verändertes Aktivitäts-, Temperatur- und/oder pH-Profil aufweisen.

Die Degeneration des genetischen Codes bietet dem Fachmann u.a.
30 die Möglichkeit, die Nukleotidsequenz der DNA-Sequenz an die Codonpräferenz ("codon usage") der Zielpflanze, also der aufgrund der Expression der Saccharoseisomerase-Nukleinsäuresequenz pathogenresistenten Pflanze bzw. Pflanzenzelle, anzupassen und die Expression dadurch zu optimieren.

35 Für die gentechnische Manipulation in prokaryontischen Zellen können die erfundungsgemäßen rekombinanten Nukleinsäuremoleküle oder Teile davon in Plasmide eingebracht werden, die eine Mutation oder eine Sequenzveränderung durch Rekombination von DNA-
40 Sequenzen erlauben. Mit Hilfe von Standardverfahren (siehe z.B. Sambrook et al. (1989), vide supra) können Basenaustausche vorgenommen oder natürliche oder synthetische Sequenzen hinzugefügt werden. Für die Verbindung der DNA-Fragmente untereinander können an die Fragmente - wo erforderlich - Adapter oder Linker angefügt
45 werden. Ferner können mittels enzymatischer und anderer Manipulationen passende Restriktionsschnittstellen zur Verfügung gestellt oder überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen

10

entfernt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen in Frage kommen, können in *vitro*-Mutagenese, "primer repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Als Analysemethoden werden im allgemeinen Sequenzanalyse, Restriktionsanalyse und 5 weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden durchgeführt.

Bevorzugt haben besagte funktionelle Äquivalente eine Homologie von mindestens 40 %, besonders bevorzugt mindestens 50 %, besonders bevorzugt mindestens 70 %, am meisten bevorzugt 10 mindestens 90 % zu einer der Polypeptidsequenzen mit der SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 oder 36. Dabei erstreckt sich die Homologie über mindestens 30 Aminosäuren, bevorzugt mindestens 60 Aminosäuren besonders bevorzugt mindestens 90 Aminosäuren, am meisten bevorzugt über die gesamte Länge eines 15 der Polypeptide gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 oder 36.

Unter Homologie zwischen zwei Polypeptiden wird die Identität der Aminosäuresequenz über die jeweilige Sequenzlänge ver-
20 standen, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

25 Gap Weight: 8 Length Weight: 2

Average Match: 2,912 Average Mismatch:-2,003

Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von
30 mindestens 80 % auf Proteinbasis mit der Sequenz SEQ ID NO: 2
aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit
der Sequenz SEQ ID NO: 2 nach obigem Programmalgorithmus mit
obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 80 % aufweist.

35 Funktionelle Äquivalente umfasst auch solche Proteine, die durch Nukleinsäuresequenzen kodiert werden, die eine Homologie von mindestens 40 %, besonders bevorzugt mindestens 50 %, besonders bevorzugt mindestens 70 %, am meisten bevorzugt mindestens 90 % zu einer der Nukleinsäuresequenzen mit der SEQ ID NO: 1, 3, 40 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 oder 35 haben. Dabei erstreckt sich die Homologie über mindestens 100 Basen, bevorzugt mindestens 200 Basen besonders bevorzugt mindestens 300 Basen, am meisten bevorzugt über die gesamte Länge einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 oder 35.

11

Unter Homologie zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen wird die Identität der beiden Nukleinsäuresequenzen über die jeweilige Sequenzlänge verstanden, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0,

5 University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA; Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389ff) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

Gap Weight: 50	Length Weight: 3
10	
Average Match: 10	Average Mismatch: 0

Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von mindestens 80 % auf Nukleinsäurebasis mit der Sequenz 15 SEQ ID NO: 1 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 nach obigem Programm-algorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 80 % aufweist.

20 Funktionelle Äquivalente umfasst auch solche Proteine, die durch Nukleinsäuresequenzen kodiert werden, die unter Standardbedingungen mit einer der durch SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 oder 35 beschriebenen Nukleinsäuresequenz, der zu dieser komplementären Nukleinsäuresequenz oder Teilen der vor- 25 genannten hybridisieren und die wesentlichen Eigenschaften einer Saacharoseisomerase aufweisen.

30 "Standardhybridisierungsbedingungen" ist breit zu verstehen und meint stringente als auch weniger stringente Hybridisierungs- 35 bedingungen. Solche Hybridisierungsbedingungen sind unter anderem bei Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T et al., in Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57) oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6.) beschrieben.

Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrittes ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit geringer Stringenz (mit ungefähr 2X SSC bei 50°C) und 40 solchen mit hoher Stringenz (mit ungefähr 0,2X SSC bei 50°C bevorzugt bei 65°C) (20X SSC: 0,3 M Natriumcitrat, 3 M NaCl, pH 7,0). Darüber hinaus kann die Temperatur während des Waschschrittes von niedrig stringenten Bedingungen bei Raumtemperatur, ungefähr 22°C, 45 bis zu stärker stringenten Bedingungen bei ungefähr 65°C angehoben werden. Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden.

Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50 % Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C ausgeführt. Einige beispielhafte Bedingungen für Hybridisierung und Waschschrift sind infolge gegeben:

(1) Hybridisierungbedingungen zum Beispiel aus nachfolgenden Bedingungen ausgewählt sein:

10 a) 4X SSC bei 65°C,
b) 6X SSC bei 45°C,
c) 6X SSC, 100 µg/ml denaturierter, fragmentierte Fischsperma-DNA bei 68°C,
f) 50 % Formamid, 4X SSC bei 42°C,
15 h) 2X oder 4X SSC bei 50°C (schwach stringente Bedingung),
i) 30 bis 40 % Formamid, 2X oder 4X SSC bei 42°C (schwach stringente Bedingung).

(2) Waschschrifte können zum Beispiel aus nachfolgenden Bedingungen ausgewählt sein:

20 a) 0,015 M NaCl/0,0015 M Natriumcitrat/0,1 % SDS bei 50°C.
b) 0,1X SSC bei 65°C.
c) 0,1X SSC, 0,5 % SDS bei 68°C.
25 d) 0,1X SSC, 0,5 % SDS, 50 % Formamid bei 42°C.
e) 0,2X SSC, 0,1 % SDS bei 42°C.
f) 2X SSC bei 65°C (schwach stringente Bedingung).

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Nukleinsäure-
30 sesequenz kodierend für ein Protein mit einer Saccharose-
isomerase-Aktivität, Nukleinsäuresequenzen, die für Proteine
mit Saccharoseisomerase-Aktivität kodierend, wobei die Nuklein-
säuren ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus

35 a) Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Aminosäuresequenz gemäß
SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 oder 36,
und
b) Nukleinsäuresequenzen kodierend für Proteine mit einer Homo-
40 logie von mindestens 40 % zu der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2,
4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 oder 36 aufweisen, und
c) Nukleinsäuresequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13,
15, 17, 19, 21 oder 35, und

d) Nukleinsäuresequenzen, die zu einer Nukleinsäuresequenz von
c) degeneriert ist, und

e) Nukleinsäuresequenzen, die eine Homologie von mindestens 40 %
5 zu einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9,
11, 13, 15, 17, 19, 21 oder 35 aufweisen, und

f) Nukleinsäuresequenzen, die mit einem komplementären Strang
10 der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11,
13, 15, 17, 19, 21 oder 35 hybridisieren,
sowie funktionell äquivalenten Fragmenten der vorgenannten.

Funktionell äquivalente Fragmente meint in Bezug auf ein Protein
15 mit Saccharoseisomerase-Aktivität bzw. eine Nukleinsäuresequenz
kodierend für eine solche, all solche Polypeptide bzw. für diese
kodierenden Nukleinsäuresequenz, die gegenüber ihrer Ausgangs-
sequenz eine Verkürzung am 5'- und/oder 3'-Ende und/oder eine
oder mehrere Deletionen aufweisen, aber nach wie vor über eine
20 Saccharoseisomerase-Aktivität verfügen, bzw. für ein Protein
mit derselben kodieren. Hierbei ist zum einen die Erzeugung
von Deletionsmutanten möglich, bei denen durch fortschreitende
Deletion vom 5'- oder vom 3'-Ende der kodierenden DNA-Sequenz
die Synthese entsprechend verkürzter Proteine erreicht werden
25 kann.

Wie oben erwähnt, können die kodierenden Sequenzen für Saccha-
roseisomerasen auch durch Signalsequenzen ergänzt sein, die für
den Transport des Genprodukts, also vorliegend des Proteins mit
30 Saccharoseisomerase-Aktivität, zu einem bestimmten Kompartiment
sorgen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sorgen Signal-
sequenzen dafür, dass die Saccharoseisomerase in die Zellwand
35 bzw. den Apoplasten der transformierten Pflanzenzellen trans-
portiert wird, d.h. die transformierten Pflanzen exprimieren eine
chimäre Saccharoseisomerase, die ein Signalpeptid für den Trans-
port in das Endoplasmatische Retikulum umfasst. Geeignete Signal-
sequenzen, die die Aufnahme in das Endoplasmatische Retikulum
40 gewährleisten, kann der Fachmann der einschlägigen Literatur
entnehmen. Besonders geeignet ist z.B. die für das Signalpeptid
des Proteinase-Inhibitor II-Gens aus Kartoffel kodierende
Sequenz (Keil et al. (1996) Nucl Acids Res 14:5641-5650; Gen-
bank Accession No. X04118). Andere geeignete Signalsequenzen
45 sorgen z.B. für die Aufnahme der Saccharoseisomerase in die
Vakuole. Hier ist als Beispiel das Signalpeptid des Patatin-Gens

aus Kartoffel (Sonnewald U et al. (1991) Plant J 1(1):95-106) zu nennen.

"Pathogenresistenz" meint das Vermindern oder Abschwächen von 5 Krankheitssymptomen einer Pflanze infolge eines Befalls durch ein Pathogen. Die Symptome können vielfältiger Art sein, umfassen aber bevorzugt solche die direkt oder indirekt zu einer Beeinträchtigung der Qualität der Pflanze, der Quantität des Ertrages, der Eignung zur Verwendung als Futter- oder Nahrungsmittel 10 führen oder aber auch Aussaat, Anbau, Ernte oder Prozessierung des Erntegutes erschweren.

"Verleihen", "bestehen", "erzeugen" oder "erhöhen" einer Pathogenresistenz meint, dass die Abwehrmechanismen einer bestimmten 15 Pflanzenart oder -sorte durch Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens im Vergleich zu dem Wildtyp der Pflanze ("Ausgangspflanze"), auf den das erfindungsgemäße Verfahren nicht angewendet wurde, unter ansonsten gleichen Bedingungen (wie beispielsweise Klima- oder Anbaubedingungen, Pathogenart etc.) eine 20 erhöhte Resistenz gegen ein oder mehrere Pathogene aufweist. Dabei äußert sich die erhöhte Resistenz bevorzugt in einer verminderten Ausprägung der Krankheitssymptome, wobei Krankheitssymptome - neben den oben erwähnten Beeinträchtigungen - auch beispielsweise die Penetrationseffizienz eines Pathogens in die 25 Pflanze oder pflanzliche Zellen oder die Proliferationseffizienz in oder auf denselben umfasst. Dabei sind die Krankheitssymptome bevorzugt um mindestens 10 % oder mindestens 20 %, besonders bevorzugt um mindestens 40 % oder 60 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 70 % oder 80 %, am meisten bevorzugt um mindestens 30 90 % oder 95 % vermindert.

"Auswahl" umfasst in Bezug auf Pflanzen, bei denen - im Unterschied oder Vergleich zur Ausgangspflanze - die Resistenz gegen mindestens ein Pathogen besteht oder erhöht ist, all die Verfahren, die eine zur Erkennung einer vorliegenden oder erhöhten 35 Pathogenresistenz geeignet sind. Dies können Symptome der Pathogeninfektion sein (z.B. Haustorium-Ausbildung bei Pilzinfektion) aber auch die oben beschriebenen Symptome umfassen, die die Qualität der Pflanze, die Quantität des Ertrages, die 40 Eignung zur Verwendung als Futter- oder Nahrungsmittel usw. betreffen.

"Pathogen" meint im Rahmen der Erfindung beispielsweise jedoch nicht einschränkend Pilze, pilzhähnliche Pathogene (wie beispielsweise Chromista; z.B. Oomyceten) sowie tierische Schädlinge wie beispielsweise Nematoden. Besonders bevorzugt sind Nematoden und Pilze. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Expression eines

Saccharoseisomerase-Proteins auch eine Resistenz gegen weitere Pathogene bewirkt..

Beispielsweise jedoch nicht einschränkend seien nachfolgende 5 Pathogene zu nennen:

1.. Pilzpathogene und pilzähnliche Pathogene:

10 Pilzpathogene und pilzähnliche Pathogene (wie z.B. Chromista) umfassen biotrophe, hemibiotrophe und nekrotrophe Pilze und stammen vorzugsweise aus der Gruppe umfassend Plasmodiophoromycota, Oomycota, Ascomycota, Chytridiomyceten, Zygomyceten, Basidiomycota und Deuteromyceten (Fungi imperfecti). Beispieldhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 1 und 2 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

Tabelle 1: Pflanzliche Pilzerkrankungen

	Erkrankung	Pathogen
20	Braunrost	<i>Puccinia recondita</i>
	Gelbrost	<i>P. striiformis</i>
	Echter Mehltau	<i>Erysiphe graminis</i>
25	Spelzenbräune	<i>Septoria nodorum</i>
	Blattdürre	<i>Septoria tritici</i>
	Ährenfusariosen	<i>Fusarium spp.</i>
	Halmbruchkrankheit	<i>Pseudocercosporella herpotrichoides</i>
30	Flugbrand	<i>Ustilago spp.</i>
	Weizensteinbrand	<i>Tilletia caries</i>
	Schwarzbeinigkeit	<i>Gaeumannomyces graminis</i>
	Anthrocnoise leaf blight	<i>Colletotrichum graminicola</i> (teleomorph: <i>Glomerella graminicola Politis</i>); <i>Glomerella tucumanensis</i> (anamorph: <i>Glomerella falcatum Went</i>)
35	Anthracnose stalk rot	
	Aspergillus ear and kernel rot	<i>Aspergillus flavus</i>
	Banded leaf and sheath spot ("Wurzeltöter")	<i>Rhizoctonia solani</i> Kuhn = <i>Rhizoctonia microsclerotia</i> J. Matz (telomorph: <i>Thanatephorus cucumeris</i>)
40	Black bundle disease	<i>Acremonium strictum</i> W. Gams = <i>Cephalosporium acremonium</i> Auct. non Corda
	Black kernel rot	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> = <i>Botryodiplodia theobromae</i>
45	Borde blanco	<i>Marasmiellus sp.</i>

	Erkrankung	Pathogen
5	Brown spot (black spot, stalk rot)	Physoderma maydis
	Cephalosporium kernel rot	Acremonium strictum = Cephalosporium acremonium
	Charcoal rot	Macrophomina phaseolina
10	Corticium ear rot	Thanatephorus cucumeris = Corticium sasakii
15	Curvularia leaf spot	Curvularia clavata, C. eragrostidis, = C. maculans (teleomorph: Cochliobolus eragrostidis), Curvularia inaequalis, C. intermedia (teleomorph: Cochliobolus intermedium), Curvularia lunata (teleomorph: Cochliobolus lunatus), Curvularia pallescens (teleomorph: Cochliobolus pallescens), Curvularia senegalensis, C. tuberculata (teleomorph: Cochliobolus tuberculatus)
	Didymella leaf spot	Didymella exitalis
20	Diplodia ear rot and stalk rot	Diplodia frumenti (teleomorph: Botryosphaeria festucae)
	Diplodia ear rot, stalk rot, seed rot and seedling blight	Diplodia maydis = Stenocarpella maydis
25	Diplodia leaf spot or streak	Stenocarpella macrospora = Diplodialeaf macrospora

Tabelle 2: Falscher Mehltau (Oomyceten)

	Erkrankung	Pathogen
30	Brown stripe downy mildew	Sclerophthora rayssiae var. zae
	Crazy top downy mildew	Sclerophthora macrospora = Sclerospora macrospora
35	Green ear downy mildew (graminicola downy mildew)	Sclerospora graminicola
	Java downy mildew	Peronosclerospora maydis = Sclerospora maydis
40	Philippine downy mildew	Peronosclerospora philippinensis = Sclerospora philippinensis
	Sorghum downy mildew	Peronosclerospora sorghi = Sclerospora sorghi
45	Spontaneum downy mildew	Peronosclerospora spontanea = Sclerospora spontanea
	Sugarcane downy mildew	Peronosclerospora sacchari = Sclerospora sacchari

Erkrankung	Pathogen
Dry ear rot (cob, kernel and stalk rot)	<i>Nigrospora oryzae</i> (teleomorph: <i>Khuskia oryzae</i>)
5 Ear rots, minor	<i>Alternaria alternata</i> = <i>A. tenuis</i> , <i>Aspergillus glaucus</i> , <i>A. niger</i> , <i>Aspergillus</i> spp., <i>Botrytis cinerea</i> (teleomorph: <i>Botryotinia fuckeliana</i>), <i>Cunninghamella</i> sp., <i>Curvularia pallens</i> , <i>Doratomyces stemonitis</i> = <i>Cephalotrichum stemonitis</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Gonatobotrys simplex</i> , <i>Pithomyces maydis</i> , <i>Rhizopus microsporus</i> Tiegh., <i>R. stolonifer</i> = <i>R. nigricans</i> , <i>Scopulariopsis brumptii</i>
10	
15 Ergot (horse's tooth)	<i>Claviceps gigantea</i> (anamorph: <i>Sphacelia</i> sp.)
20 Eyespot	<i>Aureobasidium zeae</i> = <i>Kabatiella zeae</i>
Fusarium ear and stalk rot	<i>Fusarium subglutinans</i> = <i>F. moniliforme</i> var. <i>subglutinans</i>
25 Fusarium kernel, root and stalk rot, seed rot and seedling blight	<i>Fusarium moniliforme</i> (teleomorph: <i>Gibberella fujikuroi</i>)
Fusarium stalk rot, seedling root rot	<i>Fusarium avenaceum</i> (teleomorph: <i>Gibberella avenacea</i>)
30 Gibberella ear and stalk rot (Ähren- u. Stengelfäule)	<i>Gibberella zeae</i> (anamorph: <i>Fusarium graminearum</i>)
Gray ear rot	<i>Botryosphaeria zeae</i> = <i>Physalospora zeae</i> (anamorph: <i>Macrophoma zeae</i>)
35 Gray leaf spot (Cercospora leaf spot)	<i>Cercospora sorghi</i> = <i>C. sorghi</i> var. <i>maydis</i> , <i>C. zeae-maydis</i>
Helminthosporium root rot	<i>Exserohilum pedicellatum</i> = <i>Helminthosporium pedicellatum</i> (teleomorph: <i>Setosphaeria pedicellata</i>)
35 Hormodendrum ear rot (Cladosporium rot)	<i>Cladosporium cladosporioides</i> = <i>Hormodendrum cladosporioides</i> , <i>C. herbarum</i> (teleomorph: <i>Mycosphaerella tassiana</i>)
Hyalothyridium leaf spot	<i>Hyalothyridium maydis</i>
40 Late wilt	<i>Cephalosporium maydis</i>

Erkrankung	Pathogen	
5 Leaf spots, minor	Alternaria alternata, Ascochyta maydis, A. tritici, A. zeicola, Bipolaris victoriae = Helminthosporium victoriae (teleomorph: Cochliobolus victoriae), C. sativus (anamorph: Bipolaris sorokiniana = H. sorokinianum = H. sativum), Epicoccum nigrum, Exserohilum prolatum = Drechslera prolata (teleomorph: Setosphaeria prolata)	
10	Graphium penicillioides, Leptosphaeria maydis, Leptothyrium zeae, Ophiophaerella herpotricha, (anamorph: Scolecosporiella sp.), Paraphaeosphaeria michotii, Phoma sp., Septoria zaeae, S. zeicola, S. zeina	
15	Northern corn leaf blight (white blast, crown stalk rot, stripe)	Setosphaeria turcica (anamorph: Exserohilum turcicum = Helmin- thosporium turcicum)
20	Northern corn leaf spot Helminthosporium ear rot (race 1)	Cochliobolus carbonum (anamorph: Bipolaris zeicola = Helminthosporium carbonum)
	Penicillium ear rot (blue eye, blue mold)	Penicillium spp., P. chrysogenum, P. expansum, P. oxalicum
25	Phaeocystostroma stalk rot and root rot	Phaeocystostroma ambiguum, = Phaeocyto- sporella zaeae
	Phaeosphaeria leaf spot	Phaeosphaeria maydis = Sphaerulina maydis
30	Physalospora ear rot (Botryosphaeria ear rot)	Botryosphaeria festucae = Physalospora zeicola (anamorph: Diplodia frumenti)
	Purple leaf sheath	Hemiparasitic bacteria and fungi
	Pyrenopeziza stalk rot and root rot	Phoma terrestris = Pyrenopeziza terrestris
35	Pythium root rot	Pythium spp., P. arrhenomanes, P. graminicola
	Pythium stalk rot	Pythium aphanidermatum = P. butleri L.
	Red kernel disease (ear mold, leaf and seed rot)	Epicoccum nigrum
40	Rhizoctonia ear rot (sclerotial rot)	Rhizoctonia zaeae (teleomorph: Waitea circinata)
	Rhizoctonia root rot and stalk rot	Rhizoctonia solani, Rhizoctonia zaeae

Erkrankung	Pathogen
5 Root rots, minor 10	Alternaria alternata, Cercospora sorghi, Dictochaeta fertilis, Fusarium acuminatum (teleomorph: Gibberella acuminata), F. equiseti (teleomorph: G. intricans), F. oxysporum, F. pallidoroseum, F. poae, F. roseum, G. cyanogena, (anamorph: F. sulphureum), Microdochium bolleyi, Mucor sp., Periconia circinata, Phytophthora cactorum, P. drechsleri, P. nicotianae var. parasitica, Rhizopus arrhizus
15 Rostratum leaf spot (Helminthosporium leaf disease, ear and stalk rot)	Setosphaeria rostrata, (anamorph: Exserohilum rostratum = Helminthosporium rostratum)
Rust, common corn	Puccinia sorghi
Rust, southern corn	Puccinia polyspora
Rust, tropical corn	Physopella pallescens, P. zeae = Angiopsora zeae
20 Sclerotium ear rot (southern blight)	Sclerotium rolfsii Sacc. (teleomorph: Athelia rolfsii)
25 Seed rot-seedling blight 30	Bipolaris sorokiniana, B. zeicola = Helminthosporium carbonum, Diplodia maydis, Exserohilum pedicillatum, Exserohilum turcicum = Helminthosporium turcicum, Fusarium avenaceum, F. culmorum, F. moniliforme, Gibberella zeae (anamorph: F. graminearum), Macrohomina phaseolina, Penicillium spp., Phomopsis sp., Pythium spp., Rhizoctonia solani, R. zeae, Sclerotium rolfsii, Spicaria sp.
Selenophoma leaf spot	Selenophoma sp.
Sheath rot	Gaeumannomyces graminis
Shuck rot	Myrothecium gramineum
35 Silage mold	Monascus purpureus, M. ruber
Smut, common	Ustilago zaeae = U. maydis
Smut, false	Ustilaginoidea virens
Smut, head	Sphacelotheca reiliana = Sporisorium holcisorghi
40 Southern corn leaf blight and stalk rot	Cochliobolus heterostrophus (anamorph: Bipolaris maydis = Helminthosporium maydis)
Southern leaf spot	Stenocarpella macrospora = Diplodia macrospora

Erkrankung	Pathogen
5 Stalk rots, minor	Cercospora sorghi, Fusarium episphaeria, F. merismoides, F. oxysporum Schlechtend, F. poae, F. roseum, F. solani (teleomorph: Nectria haematoxocca), F. tricinctum, Mariannaea elegans, Mucor sp., Rhopographus zaeae, Spicaria sp.
10 Storage rots	Aspergillus spp., Penicillium spp. and other fungi
15 Tar spot	Phyllachora maydis
Trichoderma ear rot and root rot	Trichoderma viride = T. lignorum teleomorph: Hypocrea sp.
White ear rot, root and stalk rot	Stenocarpella maydis = Diplodia zeae
15 Yellow leaf blight	Ascochyta ischaemi, Phyllosticta maydis (teleomorph: Mycosphaerella zeae-maydis)
Zonate leaf spot	Gloeocercospora sorghi

20

Besonders bevorzugt sind

- Plasmodiophoromycota wie Plasmodiophora brassicae (Kohlhernie, clubroot of crucifers), Spongospora subterranea (powdery scab of potato tubers), Polymyxa graminis (root disease of cereals and grasses),
- Oomycota wie Bremia lactucae (Falscher Mehltau an Salat), Peronospora (Falscher Mehltau) bei Löwenmaul (P. antirrhini), Zwiebel (P. destructor), Spinat (P. effusa), Sojabohne (P. manchurica), Tabak ("blue mold" = Blauschimmel; P. tabacina) Alfalfa und Klee (P. trifolium), Pseudoperonospora humuli (Falscher Mehltau an Hopfen), Plasmopara (Falscher Mehltau bei Trauben) (P. viticola) und Sonnenblume (P. halstedii), Sclerophothra macrospora (Falscher Mehltau bei Cerealien und Gräsern), Pythium (seed rot, seedling damping-off, and root rot and all types of plants, z.B. Wurzelbrand an Beta-Rübe durch P. debaryanum), Phytophthora infestans (Kraut- und Knollenfäule bei Kartoffel, Braunfäule bei Tomate etc.), Albugo spec. (white rust on cruciferous plants).
- Ascomycota wie Microdochium nivale (Schneeschimmel an Roggen und Weizen), Fusarium graminearum, Fusarium culmorum (Ährenfäule v.a. bei Weizen), Fusarium oxysporum (Fusarium-Welke an Tomate), Blumeria graminis (Echter Mehltau an Gerste (f.sp. hordei) und Weizen (f.sp. tritici)), Erysiphe pisi (Erbseñ-

mehltau), *Nectria galligena* (Obstbaumkrebs), *Unicnula necator* (Echter Mehltau der Weinrebe), *Pseudopeziza tracheiphila* (Roter Brenner der Weinrebe), *Claviceps purpurea* (Mutterkorn an z.B. Roggen und Gräsern), *Gaeumannomyces graminis* (Schwarzbeinigkeit an Weizen, Roggen u.a. Gräsern), *Magnaporthe grisea* (rice blast disease), *Pyrenophora graminea* (Streifenkrankheit an Gerste), *Pyrenophora teres* (Netzfleckenkrankheit an Gerste), *Pyrenophora tritici-repentis* (Blattfleckenkrankheit (Blattdürre) an Weizen), *Venturia inaequalis* (Apfelschorf), *Sclerotinia sclerotiorum* (Weißstengeligkeit, Rapskrebs), *Pseudopeziza medicaginis* (Klappenschorf an Luzerne, Weiß- und Rotklee).

- Basidiomyceten wie *Typhula incarnata* (Typhula-Fäule an 15 Gerste, Roggen, Weizen), *Ustilago maydis* (Beulenbrand an Mais), *Ustilago nuda* (Flugbrand an Gerste), *Ustilago tritici* (Flugbrand an Weizen, Dinkel), *Ustilago avenae* (Flugbrand an Hafer), *Rhizoctonia solani* (Wurzeltöter an Kartoffeln), *Sphacelotheca* spp. (head smut of sorghum), *Melampsora lini* (rust of flax), *Puccinia graminis* (Schwarzrost an Weizen, Gerste, Roggen, Hafer), *Puccinia recondita* (Braunrost an Weizen), *Puccinia dispersa* (Braunrost an Roggen), *Puccinia hordei* (Braunrost an Gerste), *Puccinia coronata* (Kronenrost an Hafer), *Puccinia striiformis* (Gelbrost an Weizen, Gerste, 20 Roggen sowie zahlreichen Gräsern), *Uromyces appendiculatus* (Bohnenrost), *Sclerotium rolfsii* (root and stem rots of many plants).

- Deuteromyceten (Fungi imperfecti) wie *Septoria nodorum* 30 (Spelzenbräune) an Weizen (*Septoria tritici*), *Pseudocercospora herpotrichoides* (Halmbruchkrankheit an Weizen, Gerste, Roggen), *Rynchosporium secalis* (Blattfleckenkrankheit an Roggen und Gerste), *Alternaria solani* (Dürrfleckenkrankheit an Kartoffel, Tomate), *Phoma betae* (Wurzelbrand an Beta-Rübe), *Cercospora beticola* (Cercospora-Blattfleckenkrankheit an Beta-Rübe), (*Alternaria brassicae* (Rapsschwärze an Raps, Kohl u.a. Kreuzblütlern), *Verticillium dahliae* (Rapswelke und -stengelfäule), *Colletotrichum lindemuthianum* (Brennfleckenkrankheit an Bohne), *Phoma lingam* - Umfallkrankheit (Schwarzbeinigkeit an Kohl; Wurzelhals- oder Stengelfäule an Raps), *Botrytis cinerea* (Grauschimmel an Weinrebe, Erdbeere, Tomate, Hopfen etc.).

Am meisten bevorzugt sind *Phytophthora infestans* (Kraut- und 45 Knollenfäule, Braunfäule bei Tomate etc.), *Microdochium nivale* (vormals *Fusarium nivale*; Schneeschimmel an Roggen und Weizen), *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* (Ährenfäule an Weizen),

Fusarium oxysporum (Fusarium-Welke an Tomate), Blumeria graminis (Echter Mehltau an Gerste (f.sp. hordei) und Weizen (f.sp. tritici)), Magnaporthe grisea (rice blast disease), Sclerotinia sclerotiorum (Weißstengelfäule, Rapskrebs), Septoria nodorum und Septoria tritici (Spelzenbräune an Weizen), Alternaria brassicae (Rapsschwärze an Raps, Kohl u.a. Kreuzblütlern), Phoma lingam (Umfallkrankheit, Schwarzbeinigkeit an Kohl; Wurzelhals- oder Stengelfäule an Raps).

10 2. Tierische Schädlinge

Bei den im Rahmen dieser Erfindung als zur Bekämpfung bevorzugten pflanzenschädigenden Nematoden sind folgende Gruppen bespielhaft – jedoch nicht einschränkend – zu nennen:

15

- a) Freilebende, wandernde Wurzelnematoden: (z.B. Pratylenchus, Xiphinema und Longidorus-Arten).

Wandernden Nematoden sind nicht an eine Parasitierungsstelle gebunden, sondern können diese wechseln. Sie können von einer Wurzel zur anderen, von einer Pflanze zur anderen und zum Teil auch im Pflanzengewebe wandern. Lange Zeit hat man ihre Bedeutung als Schädlinge unterschätzt: Heute zählen sie zu den überaus gefährlichen pflanzenschädigenden Nematoden. Viele Wachstumsschäden (auch sog. "Bodenmüdigkeit") und frühzeitiges Vergilben der Kulturpflanzen konnten auf derartige Wurzelschädlinge zurückgeführt werden. Vor allem Pratylenchus Arten sind auch im Zierpflanzenbau als Ursache heftiger Wurzelschäden bekannt. Erkrankte Wurzeln sind daran zu erkennen, dass sie stellenweise braune Verfärbungen aufweisen. In die hervorgerufenen Wunden dringen nachträglich auch Fäulnisorganismen ein, die ein rasches Absterben des Gewebes und tiefgehende Fäulnis an diesen Stellen zur Folge haben. Wirtspflanzen sind unter anderen: div. Getreidearten, Erdäpfel, Kartoffeln, Paradeiser, Gurken, Sellerie und Wein.

35

- b) Wurzelgallenerzeugende Nematoden (z.B. Meloidogyne- Arten)

Die Larven dieser Arten bohren sich meist nahe der Spitze in die Wurzeln ein und verursachen durch Ausscheidungen ihrer Speicheldrüsen Verdickungen (Gallen) des sie umgebenden Pflanzengewebes. In diesen Gallen überdauern sie und gelangen entweder aktiv oder nach Zerfall der Gallen wieder in den Boden zurück. Die Störung im Stoffwechsel der Pflanze infolge des Schädlingsbefalls macht sich in mehr oder weniger kümmerlichem Wuchs und allgemeinem Kränkeln der Pflanze bemerkbar. Wurzelgallenälchen zählen vor allem in Gewächshäusern zu den größten Schädlingen, wurden aber

auch im Freiland an Karotten, Sellerie und Petersilie nachgewiesen.

c) Nematoden als Schädlinge der Blütenanlagen: (*Anguina tritici*)

5

Das Weizenälchen ist ein spezialisierter Parasit der Blütenanlage des Weizens, die sie in Gallen umwandelt. Bereits im Jungstadium der Pflanze ist der Nematodenbefall an den Wellungen oder Kräuselungen der Blätter zu erkennen.

10

d) Zystenbildende Wurzelnematoden: (*Globodera*- und *Heterodera*-Arten)

Das Kartoffelzystenälchen ist der Kartoffelfeind Nummer 1. Diese 15 Art übertrifft hinsichtlich ihrer Schädlichkeit alle anderen *Heterodera*-Arten und kann bei massiven Ausbruch bis zu 80% der Ernte vernichten. Nach dem Befall mit zystenbildenden Nematoden kümmert die Pflanze ohne äußerlich erkennbare Ursache. Erst wenn man die Wurzeln untersucht, erkennt man stecknadelkopfgroße, 20 bräunlich, gelbe oder weiße Zysten. Die weiblichen Nematoden bohren sich in die Wurzel und sprengen durch ihren mit Eiern gefüllten und dadurch anschwellenden Hinterleib die Wurzel. Der Nematode steckt mit seinem Mundstachel noch in der Wurzel, während der prall gefüllte Hinterleib im Erdreich liegt. Das Muttertier 25 stirbt und seine sich verfestigende Haut wird zur Schutzhülle (Zyste) für die Eier und Larven. Die Zysten samt Inhalt sind sehr widerstandsfähig und können lange Zeit überdauern. Bei geeigneten Umweltbedingungen bohren sich die Larven ins Freie und befallen neue Wurzeln. Die wichtigsten zystenbildende Nematoden sind 30 Kartoffel-, Rüben-, Hafer-, Erbsen-, Klee-, Kohl-, Hopfen-, Möhrenzystenälchen (Untersuchung auf Kartoffelzystennematoden siehe auch unter: <http://www.bfl.at/>)

Als tierische Schädlinge sind insbesondere Nematoden bevorzugt.

35 Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 3 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

Tabelle 3: Parasitäre Nematoden

40

Schädigung	Pathogene Nematode
Awl	<i>Dolichodorus</i> spp., <i>D. heterocephalus</i>
Stengel- oder Stockälchen, Rübenkopfälchen ("Bulb and stem"; Europe)	<i>Ditylenchus dipsaci</i>
Burrowing	<i>Radopholus similis</i>

	Schädigung	Pathogene Nematode
	Haferzystenälchen ("Cyst")	Heterodera avenae, H. ziae, Punctodera chalcoensis
5	Dagger	Xiphinema spp., X. americanum, X. mediterraneum
	False root-knot	Nacobbus dorsalis
	Lance, Columbia	Hoplolaimus columbus
10	Lance	Hoplolaimus spp., H. galeatus
	Lesion	Pratylenchus spp., P. brachyurus, P. crenatus, P. hexincisus, P. neglectus, P. penetrans, P. scribneri, P. thornei, P. ziae
	Needle	Longidorus spp., L. breviannulatus
15	Ring	Criconemella spp., C. ornata
	Wurzelgallenälchen ("Root-knot")	Meloidogyne spp., M. chitwoodi, M. incognita, M. javanica
	Spiral	Helicotylenchus spp.
	Sting	Belonolaimus spp., B. longicaudatus
20	Stubby-root	Paratrichodorus spp., P. christiei, P. minor, Quinisulcius acutus, Trichodorus spp.
	Stunt	Tylenchorhynchus dubius

25 Ganz besonders bevorzugt sind Globodera rostochiensis und G. pallida (Zystenälchen an Kartoffel, Tomate u.a. Nachtschattengewächsen), Heterodera schachtii (Rübenzystenälchen an Zucker- und Futterrübe, Raps, Kohl etc.), Heterodera avenae (Haferzystenälchen an Hafer u.a. Getreidearten), Ditylenchus dipsaci (Stengel- oder Stockälchen, Rübenkopfälchen an Roggen, Hafer, Mais, Klee, Tabak, Rübe), Anguina tritici (Weizenälchen, Radekrankheit an Weizen (Dinkel, Roggen), Meloidogyne hapla (Wurzelgallenälchen an Möhre, Gurke, Salat, Tomate, Kartoffel, Zuckerrübe, Luzerne)).

30

35

Bevorzugt wird in den einzelnen Pflanzenarten eine Resistenz gegen nachfolgende beispielhaft genannte Pilzpathogene erzielt:

40 1. Gerste: Puccinia graminis f.sp. hordei (barley stem rust), Blumeria (Erysiphe) graminis f.sp. hordei (Barley Powdery Mildew).

45 2. Sojabohne: Phytophthora megasperma fsp.glycinea, Macrophomina phaseolina, Rhizoctonia solani, Sclerotinia sclerotiorum, Fusarium oxysporum, Diaporthe phaseolorum var. sojae (Phomopsis sojae), Diaporthe phaseolorum var. caulinivora, Sclerotium

rolfsii, Cercospora kikuchii, Cercospora sojina, Peronospora manshurica, Colletotrichum dematium (Colletotrichum truncatum), Corynespora cassiicola, Septoria glycines, Phyllosticta sojicola, Alternaria alternata, Microsphaera diffusa,
5 Fusarium semitectum, Phialophora gregata, Glomerella glycines, Phakopsorapachyrhizi, Pythium aphanidermatum, Pythium ultimum, Pythium debaryanum, Fusarium solani.

3. Canola: *Albugo candida*, *Alternaria brassicae*, *Leptosphaeria maculans*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*,
10 *Mycosphaerella brassiccola*, *Pythium ultimum*, *Peronospora parasitica*, *Fusarium roseum*, *Alternaria alternata*.

4. Alfalfa: *Clavibacter michiganense* subsp. *insidiosum*, *Pythium ultimum*, *Pythium irregularé*, *Pythium splendens*, *Pythium debaryanum*, *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora megasperma*,
15 *Peronospora trifoliorum*, *Phoma medicaginis* var. *medicaginis*, *Cercospora medicaginis*, *Pseudopeziza medicaginis*, *Leptotrichila medicaginis*, *Fusarium*, *Aphanomyces euteiches*, *Stemphylium herbarum*, *Stemphylium alfalfae*.

5. Weizen: *Urocystis agropyri*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium avenaceum*,
20 *Fusarium culmorum*, *Ustilago tritici*, *Ascochyta tritici*, *Cephalosporium gramineum*, *Colletotrichum graminicola*, *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici*, *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*, *Puccinia recondita* f.sp. *tritici*, *Puccinia striiformis*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Septoria nodorum*, *Septoria tritici*, *Septoria avenae*, *Pseudocercospora herpotrichoides*,
25 *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia cerealis*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium arrhenomannes*, *Pythium ultimum*, *Bipolaris sorokiniana*, *Claviceps purpurea*, *Tilletia tritici*, *Tilletia laevis*, *Ustilago tritici*, *Tilletia indica*, *Rhizoctonia solani*,
30 *Pythium arrhenomannes*, *Pythium gramicola*, *Pythium aphanidermatum*, *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* (Wheat stem rust), *Blumeria* (*Erysiphe*) *graminis* f.sp. *tritici* (Wheat Powdery Mildew)

40 6. Sonnenblume: *Plasmophora halstedii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Aster Yellows*, *Septoria helianthi*, *Phomopsis helianthi*, *Alternaria helianthi*, *Alternaria zinniae*, *Botrytis cinerea*, *Phoma macdonaldii*, *Macrophomina phaseolina*, *Erysiphe cichoracearum*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus stolonifer*, *Puccinia helianthi*, *Verticillium dahliae*,
45

Cephalosporium acremonium, *Phytophthora cryptogea*, *Albugo tragopogonis*.

7. Mais: *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*, *Fusarium moniliforme*, *Gibberella zae* (*Fusarium graminearum*), *Stenocarpella maydis* (*Diplodia maydis*), *Pythium irregularare*, *Pythium debaryanum*, *Pythium graminicola*, *Pythium splendens*, *Pythium ultimum*, *Pythium aphanidermatum*, *Aspergillus flavus*, *Bipolaris maydis* O, T (*Cochliobolus heterostrophus*), *Helminthosporium carbonum* I, II & III (*Cochliobolus carbonum*), *Exserohilum turcicum* I, II & III, *Helminthosporium pedicellatum*, *Physoderma maydis*, *Phyllosticta maydis*, *Kabatiella maydis*, *Cercospora sorghi*, *Ustilago maydis*, *Puccinia sorghi*, *Puccinia polysora*, *Macrophomina phaseolina*, *Penicillium oxalicum*, *Nigrospora oryzae*, *Cladosporium herbarum*, *Curvularia lunata*, *Curvularia inaequalis*, *Curvularia pallens*, *Trichoderma viride*, *Claviceps sorghi*, *Cornstunt spiroplasma*, *Diplodia macrospora*, *Sclerotinia macrospora*, *Peronosclerospora sorghi*, *Peronosclerospora philippinensis*, *Peronosclerospora maydis*, *Peronosclerospora sacchari*, *Spacelotheca reiliana*, *Physopella zae*, *Cephalosporium maydis*, *Caphalosporium acremonium*.

8. Sorghum: *Exserohilum turcicum*, *Colletotrichum graminicola* (*Glomerella graminicola*), *Cercospora sorghi*, *Gloeocercospora sorghi*, *Ascochyta sorghina*, *Puccinia purpurea*, *Macrophomina phaseolina*, *Perconia circinata*, *Fusarium moniliforme*, *Alternaria alternate*, *Bipolaris sorghicola*, *Helminthosporium sorghicola*, *Curvularia lunata*, *Phoma insidiosa*, *Ramulispora sorghi*, *Ramulispora sorghicola*, *Phyllachara sacchari*, *Sporisorium reilianum* (*Sphaelotheca reiliana*), *Sphaelotheca cruenta*, *Sporisorium sorghi*, *Claviceps sorghi*, *Rhizoctonia solani*, *Acremonium strictum*, *Sclerotinia macrospora*, *Peronosclerospora sorghi*, *Peronosclerospora philippinensis*, *Sclerospora graminicola*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium arrhenomanes*, *Pythium graminicola*.

Bevorzugt wird in den einzelnen Pflanzenarten eine Resistenz gegen nachfolgende beispielhaft genannte Nematodenpathogene erzielt:

Zucker- rübe	Zuckerrübenzystenälchen (Sugar beet cyst nematode)	<i>Heterodera schachtii</i>
Kartoffel	Columbia Wurzelgal- lenälchen (Columbia Root- knot Nematode)	<i>Meloidogyne chitwoodi</i>
	Golden Nematode	<i>Globodera rostochiensis</i>

	Nördliches Wurzelgal- lenälchen (Northern Root Knot Nema- tode)	Meloidogyne hapla
5	Potato Rot Nematode	Ditylenchus destructor
	Sojabohne Sojabohnezystenälchen (Soybean cyst nematode; SCN)	Heterodera glycines
10	Mais Maiszystenälchen (Corn Cyst Nematode)	Heterodera zae
15	Wurzelgallenälchen (Root-Knot Nematodes)	Meloidogyne species: Meloidogyne arenaria Meloidogyne graminicola Meloidogyne chitwoodi Meloidogyne hapla Meloidogyne incognita Meloidogyne javanica

"Pflanzlicher Organismus oder von diesem abgeleitete Zellen" meint allgemein jede Zelle, Gewebe, Teile oder Vermehrungsgut (wie Samen oder Früchte) eines Organismus, der zur Photosynthese befähigt ist. Eingeschlossen sind im Rahmen der Erfindung alle Gattungen und Arten höherer und niederer Pflanzen des Pflanzenreiches. Einjährige, mehrjährige, monocotyledone und dicotyledone Pflanzen sind bevorzugt. Eingeschlossen sind reife Pflanze, Saatgut, Sprosse und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut (zum Beispiel Knollen, Samen oder Früchte) und Kulturen, zum Beispiel Zell- oder Kalluskulturen. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen Entwicklungsstadium.

30

"Pflanze" im Rahmen der Erfindung meint alle Gattungen und Arten höherer und niederer Pflanzen des Pflanzenreiches. Eingeschlossen unter dem Begriff sind die reifen Pflanzen, Saatgut, Sprosse und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut, Pflanzenorgane, Gewebe, Protoplasten, Kallus und andere Kulturen, zum Beispiel Zellkulturen, sowie alle anderen Arten von Gruppierungen von Pflanzenzellen zu funktionellen oder strukturellen Einheiten. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen Entwicklungsstadium.

"Pflanze" umfasst alle einjährigen und mehrjährigen, monokotyledonen und dikotyledonen Pflanzen und schließt beispielhaft jedoch nicht einschränkend solche der Gattungen Cucurbita, Rosa, Vitis, Juglans, Fragaria, Lotus, Medicago, Onobrychis, Trifolium, Trigonella, Vigna, Citrus, Linum, Geranium, Manihot, Daucus,

Arabidopsis, Brassica, Raphanus, Sinapis, Atropa, Capsicum, Datura, Hyoscyamus, Lycopersicon, Nicotiana, Solarium, Petunia, Digitalis, Majorana, Cichorium, Helianthus, Lactuca, Bromus, Asparagus, Antirrhinum, Heterocallis, Nemesis, Pelargonium, 5 Panicum, Pennisetum, Ranunculus, Senecio, Salpiglossis, Cucumis, Browalia, Glycine, Pisum, Phaseolus, Lolium, Oryza, Zea, Avena, Hordeum, Secale, Triticum, Sorghum, Picea und Populus ein.

Bevorzugt sind Pflanzen nachfolgender Pflanzenfamilien: Amaranthaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Carophyllaceae, Chenopodiaceae, 10 Compositae, Cruciferae, Cucurbitaceae, Labiatae, Leguminosae, Papilionoideae, Liliaceae, Linaceae, Malvaceae, Rosaceae, Rubiaceae, Saxifragaceae, Scrophulariaceae, Solanaceae, Sterculiaceae, Tetragoniacea, Theaceae, Umbelliferae.

15

Bevorzugte monokotyle Pflanzen sind insbesondere ausgewählt aus den monokotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel der Familie der Gramineae wie Reis, Mais, Weizen oder andere Getreidearten wie Gerste, Hirse, Roggen, Triticale oder Hafer sowie dem Zuckerrohr 20 sowie alle Arten von Gräsern.

Die Erfindung wird ganz besonders bevorzugt auf dikotyledone pflanzliche Organismen angewendet. Bevorzugte dikotyle Pflanzen sind insbesondere ausgewählt aus den dikotylen Kulturpflanzen, 25 wie zum Beispiel

- Asteraceae wie Sonnenblume, Tagetes oder Calendula und andere mehr,
- 30 - Compositae, besonders die Gattung Lactuca, ganz besonders die Art sativa (Salat) und andere mehr,
- Cruciferae, besonders die Gattung Brassica, ganz besonders die Arten napus (Raps), campestris (Rübe), oleracea cv Tastie 35 (Kohl), oleracea cv Snowball Y (Blumenkohl) und oleracea cv Emperor (Broccoli) und weitere Kohlarten; und der Gattung Arabidopsis, ganz besonders die Art thaliana sowie Kresse oder Canola und andere mehr,
- 40 - Cucurbitaceae wie Melone, Kürbis oder Zucchini und andere mehr,
- Leguminosae besonders die Gattung Glycine, ganz besonders die Art max (Sojabohne) sowie Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen oder Erdnuss und andere mehr

45

- Rubiaceae, bevorzugt der Unterklasse Lamiidae wie beispielsweise Coffea arabica oder Coffea liberica (Kaffeestrauch) und andere mehr,
- 5 - Solanaceae besonders die Gattung Lycopersicon, ganz besonders die Art esculentum (Tomate), die Gattung Solanum, ganz besonders die Art tuberosum (Kartoffel) und melongena (Aubergine), und die Gattung Capsicum, ganz besonders die Art annum (Paprika) sowie Tabak und andere mehr,
- 10 - Sterculiaceae, bevorzugt der Unterklasse Dilleniidae wie beispielsweise Theobroma cacao (Kakastrauch) und andere mehr,
- Theaceae, bevorzugt der Unterklasse Dilleniidae wie beispielsweise Camellia sinensis oder Thea sinensis (Teestrauch) und andere mehr,
- 15 - Umbelliferae, besonders die Gattung Daucus (ganz besonders die Art carota (Karotte)) und Apium (ganz besonders die Art graveolens dulce (Selarie)) und andere mehr,
- 20 - sowie Lein, Soja, Baumwolle, Hanf, Flachs, Gurke, Spinat, Möhre, Zuckerrübe und den verschiedenen Baum-, Nuss- und Weinarten, insbesondere Banane und Kiwi.
- 25 - Umfasst sind ferner Schmuckpflanzen, Nutz- oder Zierbäume, Blumen, Schnittblumen, Sträucher oder Rasen. Beispielhaft aber nicht einschränkend seien zu nennen Angiospermen, Bryophyten wie zum Beispiel Hepaticae (Leberblümchen) und Musci (Moose);
- 30 - Pteridophyten wie Farne, Schachtelhalm und Lycopoden; Gymnospermen wie Koniferen, Cycaden, Ginkgo und Gnetalen, die Familien der Rosaceae wie Rose, Ericaceae wie Rhododendrons und Azaleen, Euphorbiaceae wie Weihnachtssterne und Kroton, Caryophyllaceae wie Nelken, Solanaceae wie Petunien, Gesneriaceae wie das
- 35 - Usambaraveilchen, Balsaminaceae wie das Springkraut, Orchidaceae wie Orchideen, Iridaceae wie Gladiolen, Iris, Freesie und Krokus, Compositae wie Ringelblume, Geraniaceae wie Geranien, Liliaceae wie der Drachenbaum, Moraceae wie Ficus, Araceae wie Philodendron und andere mehr.
- 40 - Am meisten bevorzugt sind landwirtschaftliche Nutzpflanzen, die von Natur aus einen hohen Anteil an Saccharose aufweisen oder deren Wurzeln, Knollen oder Speicherwurzeln wirtschaftlich verwertet werden, wie z.B. Kartoffel, Rübe oder Zuckerrübe.
- 45 - Ebenfalls bevorzugt sind Tomate, Banane, Karotte, Zuckerrohr, Erdbeere, Ananas, Papaya, Soja sowie Getreidearten wie Hafer,

Gerste, Weizen, Roggen, Triticale, Hirse und Mais. Am meisten bevorzugt sind Kartoffel, Rübe, Zuckerrübe und Zuckerrohr.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kommen Expressionskonstrukte 5 zur Expression von Proteinen mit Saccharoseisomerase-Aktivität in Pflanzen zum Einsatz. Derartige Expressionskassetten sind beispielsweise in WO 01/59136 und WO 01/59135 beschrieben, worauf hiermit ausdrücklich Bezug genommen wird.

10 In besagten Expressionskonstrukten steht ein Nukleinsäuremolekül kodierend für ein Protein mit Saccharosisomerase-Aktivität (z.B. beschrieben durch SEQ ID NO: 2 oder eines funktionellen Äquivalentes desselben oder eines funktionell äquivalenten Teils der vorgenannten) bevorzugt in funktioneller Verknüpfung 15 mit mindestens einem genetischen Kontrollelement (beispielsweise einem Promotor), das eine transgene Expression in einem pflanzlichen Organismus oder einem Gewebe, Organ, Teil oder Zelle desselben gewährleistet.

20 Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man zum Beispiel die sequentielle Anordnung eines Promotors mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz (zum Beispiel der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1) und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel einem Terminator derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der transgenen Expression der Nukleinsäuresequenz erfüllen kann. Dazu ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar 30 von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevorzugt sind Anordnungen, in denen die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz hinter der als Promoter fungierenden Sequenz positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind.

35 Die Herstellung einer funktionellen Verknüpfung als auch die Herstellung eines Expressionskonstruktes kann mittels gängiger Rekombinations- und Klonierungstechniken realisiert werden, wie sie beispielsweise in Maniatis T, Fritsch EF und Sambrook J 40 (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Silhavy TJ, Berman ML und Enquist LW (1984) Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Ausubel FM et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing 45 Assoc. and Wiley Interscience und bei Gelvin et al. (1990) In: Plant Molecular Biology Manual beschrieben sind. Zwischen beide Sequenzen können aber auch weitere Sequenzen positioniert werden,

die zum Beispiel die Funktion eines Linkers mit bestimmten Restriktionsenzymschnittstellen, einer att-Sequenz für Rekombinasen oder eines Signalpeptides haben. Auch kann die Insertion von Sequenzen zur Expression von Fusionsproteinen führen. Bevor-
5 zugt kann das transgene Expressionskonstrukt, bestehend aus einer Verknüpfung von Promoter und zu exprimierender Nukleinsäure-sequenz, integriert in einem Vektor vorliegen und durch zum Beispiel Transformation in ein pflanzliches Genom insertiert werden.

10

Unter einem Expressionskonstrukt sind aber auch solche Konstruktionen zu verstehen, bei denen die Nukleinsäuresequenz kodierend für das Proteins mit Saccharosisomerase-Aktivität (z.B. kodiert durch SEQ ID NO: 2 oder ein funktionelles Äqui-
15 valent desselben oder ein funktionell äquivalentes Teil der vorgenannten) – zum Beispiel durch eine homologe Rekombination – so hinter einen endogenen pflanzlichen Promotor platziert wird, dass dieser die transgene Expression der besagten Nukleinsäuresequenz gewährleistet.

20

Pflanzenspezifische Promotoren meint grundsätzlich jeden Promotor, der die Expression von Genen, insbesondere Fremdgenen, in Pflanzen oder Pflanzenteilen, -zellen, -geweben, -kulturen steuern kann. Dabei kann der Promotor so gewählt sein, dass
25 die Expression konstitutiv erfolgt oder nur in einem bestimmten Gewebe oder Organ, zu einem bestimmten Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung und/oder zu einem durch äußere Einflüsse, biotische oder abiotische Stimuli bestimmten Zeitpunkt (induzierte Genexpression). In Bezug auf die zu transformierende Pflanze kann
30 der Promotor homolog oder heterolog sein. Bevorzugt sind:

a) Konstitutive Promotoren

35 "Konstitutive" Promotoren meint solche Promotoren, die eine Expression in zahlreichen, bevorzugt allen, Geweben über einen größeren Zeitraum der Pflanzenentwicklung, bevorzugt zu allen Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung, gewährleisten (Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202). Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor
40 oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der Promotor des 35S-Transkriptes des CaMV Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294; Odell et al. (1985) Nature 313:810-812; Shewmaker et al. (1985) Virology 140:281-288; Gardner et al. (1986) Plant Mol Biol 6:221- 228) oder der 19S CaMV Promotor
45 (US 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202). Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor

ist der LeguminB-Promotor (GenBank Acc.-No. X03677), der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobacterium, der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus Agrobacterium, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al. (1995) Plant Mol Biol 29:637-649), der Ubiquitin 1 Promotor (Christensen et al. (1992) Plant Mol Biol 18:675-689; Bruce et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:9692-9696), der Smas Promotor, der Cinnamylalkoholdehydrogenase-Promotor (US 5,683,439), die Promotoren der vakuolärer ATPase Unter-
10 einheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991), sowie weitere Promotoren von Genen, deren konstitutive Expression in Pflanzen dem Fachmann bekannt ist. Als konstitutiver Promotor insbesondere bevorzugt ist der Promotor des Nitrilase-1 (nit1) Gens aus A. thaliana (GenBank Acc.-No.: Y07648.2, Nukleotide 2456-4340, Hillebrand et al. (1996) Gene 170:197-200).

20 b) Gewebespezifische Promotoren
Bevorzugt sind ferner Promotoren mit Spezifitäten für die Blätter, Stengel, Wurzeln oder Samen.

Samenspezifische Promotoren wie zum Beispiel der Promotor des Phaseolins (US 5,504,200; Bustos MM et al. (1989) Plant Cell 1(9):839-53; z.B. aus Phaseolus vulgaris; van der Geest et al. (1996) Plant Mol Biol 32:579-588), des 2S Albumins (Joseffson LG et al. (1987) J Biol Chem 262:12196-12201), des Legumins (Shirsat A et al. (1989) Mol Gen Genet 215(2):326-331), des USP (unknown seed protein; Bäumlein H et al. (1991) Mol Gen Genet 225(3):459-467; Phillips et al. (1997) EMBO J 16:4489-4496), des Napin Gens (US 5,608,152; Stalberg K et al. (1996) L Planta 199:515-519), des Saccharosebinde-
30 proteins (WO 00/26388), der Hordein-Promotor (Brandt et al. (1985) Carlsberg Res. Commun. 50:333-345) oder der Legumin B4-Promotor (LeB4; Bäumlein H et al. (1991) Mol Gen Genet 225:121-128; Bäumlein H et al. (1992) Plant J 2(2):233-239; Fiedler U et al. (1995) Biotechnology (NY) 13(10):1090f), der Oleosin-Promoter aus Arabidopsis (WO 98/45461), der Bce4-Promoter aus Brassica (WO 91/13980)..

40 Weitere geeignete samenspezifische Promotoren sind die der Gene kodierend für das "High Molecular Weight Glutenin" (HMWG), Gliadin, Verzweigungsenzym, ADP Glucose Pyro-
45 phosphatase (AGPase), der Napin-Promotor, der ACP-Promotor und die FatB3- und FatB4-Promotoren, der Promotor der Stärke- synthase oder anderer Stärke bildender/modifizierender Enzyme wie z.B. Promotoren von Genen die für Verzweigungsenzyme

kodieren (WO 92/14827, WO 92/11375). Bevorzugt sind ferner Promotoren, die eine samenspezifische Expression in Monokotyledonen wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis etc. erlauben. Vorteilhaft eingesetzt werden können der Promoter des lpt2 oder lpt1-Gen (WO 95/15389, WO 95/23230) oder die Promotoren beschrieben in WO 99/16890 (Promotoren des Hordein-Gens, des Glutelin-Gens, des Oryzin-Gens, des Prolamin-Gens, des Gliadin-Gens, des Glutelin-Gens, des Zein-Gens, des Kasirin-Gens oder des Secalin-Gens). Weitere samenspezifische Promotoren sind beschrieben in WO 89/03887.

15 - Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren wie beispielsweise der Patatin Promotor Klasse I (B33), der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel. Besonders bevorzugt ist dabei der B33-Promotor des Klasse I Patatin-Gens aus *Solanum tuberosum* (Rocha-Sosa et al. 1989) EMBO J 8:23-29). Der Promotor des Klasse I Patatin-Gens ist in Knollen ca. 100 bis 1000 mal aktiver als in Blättern (Rocha-Sosa et al., vide supra). Weitere Gene mit knollenspezifischer oder zumindest in Knollen verstärkter Expression sind bekannt (z.B. der Promotor der ADP-Glukose-Pyrophosphorylase-Gene; Müller et al. 1990) Mol Genet 224:136-146).

20 - Blattspezifische Promotoren wie Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO 97/05900), der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase; US 4,962,028) oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al. 1989) EMBO J 8:2445-2451). Ganz besonders bevorzugt sind epidermis-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der Promotor des OXLP-Gens ("Oxalat-Oxidase like protein"; Wei et al. 1998) Plant Mol Biol 36:101-112).

25

30

35 c) Chemisch induzierbare Promotoren

c) Chemisch induzierbare Promotoren

40 Die transgenen Expressionskonstrukte können auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten (Übersichtsartikel: Gatz et al. (1997) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48:89-108), durch den die Expression des exogenen Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), ein durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzolsulfonamid-induzierbarer Promotor (EP 0 388 186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J 45

2:397-404), ein durch Abscisinsäure induzierbarer Promotor (EP 0 335 528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer Promotor (WO 93/21334) können ebenfalls verwendet werden.

5

d) Entwicklungsabhängige Promotoren

Weitere geeignete Promotoren sind beispielsweise Fruchtreifung-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der Fruchtreifung-spezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794, EP 409 625). Entwicklungsabhängige Promotoren schließt zum Teil die Gewebespezifischen Promotoren ein, da die Ausbildung einzelner Gewebe naturgemäß entwicklungsabhängig erfolgt.

15 e) Stress- oder Pathogen-induzierbare Promotoren

Ferner sind Promotoren bevorzugt, die durch biotischen oder abiotischen Stress induziert werden wie beispielsweise der pathogen-induzierbare Promotor des PRP1-Gens (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), der hitzeinduzierbare hsp70- oder hsp80-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare alpha-Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814) oder der licht-induzierbare PPDK Promotor.

25 Pathogen-induzierbare Promotoren umfassen die Promotoren von Genen, die infolge eines Pathogenbefalls induziert werden wie beispielsweise Gene von PR-Proteinen, SAR-Proteinen, β -1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) Neth J Plant Pathol 89:245-254; Uknas et al. (1992) Plant Cell 4:645-656; Van Loon (1985) Plant Mol Viral 4:111-116; Marineau et al. (1987) Plant Mol Biol 9:335-342; Matton et al. (1987) Molecular Plant-Microbe Interactions 2:325-342; Somssich et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:2427-2430; Somssich et al. (1988) Mol Gen Genetics 2:93-98; Chen et al. (1996) Plant J 10:955-966; Zhang and Sing (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:2507-2511; Warner, et al. (1993) Plant J 3:191-201; Siebertz et al. (1989) Plant Cell 1:961-968 (1989).

40 Umfasst sind auch verwundungs-induzierbare Promotoren wie der des pinII Gens (Ryan (1990) Ann Rev Phytopath 28:425-449; Duan et al. (1996) Nat Biotech 14:494-498; EP-A 375 091), des wun1 und wun2-Gens (US 5,428,148), des win1- und win2-Gens (Stanford et al. (1989) Mol Gen Genet 215:200-208), des Systemin Gens (McGurl et al. (1992) Science 225:1570-1573), des WIP1-Gens (Rohmeier et al. (1993) Plant Mol Biol 22:783-792; Eckelkamp et al. (1993) FEBS Letters 323:73-76),

des MPI-Gens (Corderok et al. (1994) Plant J 6(2):141-150) und dergleichen.

5 Besonders bevorzugt sind Promotoren, die speziell in Nährzellsystemen (Syncytien) nach Nematodenbefall induziert werden. Beispielhaft seien zu nennen

- 10 i) der Δ 0.3 TobRB7 Promotor aus Tabak (Opperman et al. (1994) Science 263: 221-223), insbesondere der durch SEQ ID NO: 24 beschriebene Promotor,
- 15 ii) der Lemmi9 Promotor aus Tomate (Escobar et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12: 440-449), insbesondere der durch SEQ ID NO: 23 beschriebene Promotor, sowie
- iii) Geminivirus V-sense Promotoren (WO 00/01832), insbesondere die durch SEQ ID NO: 32, 33 oder 34 beschriebenen Promotoren.

20 Weitere im Rahmen dieser Erfindung bevorzugte nematoden-induzierbare Promotoren sind in WO 98/22599 beschrieben. Insbesondere bevorzugt sind dabei die regulatorischen Bereiche (d.h. die dem ATG-Startkodon vorgelagerten Bereiche) der Sequenzen mit den GenBank Acc.-No.: A91914 (Basenpaare 1 bis 3480). Ferner bevorzugt 25 sind die in US 6,395,963 beschriebenen Promotorsequenzen, die in WO 03/033651 beschriebenen Promotorsequenzen, die in JP 2001508661-A beschriebenen Promotorsequenzen (insbesondere die Sequenz mit den GenBank Acc.-No.: BD056958), sowie die in WO 97/46692 beschriebenen Promotorsequenzen (insbesondere die Sequenz mit den GenBank Acc.-No.: A79355; Basenpaare 1 bis 2127, oder 1 bis 2160). Weitere nematoden-induzierbare Promotoren können von Genen abgeleitet werden, deren Induktion infolge eines Nematodenbefalls beschrieben ist. Beispielhaft - jedoch nicht einschränkend - sind zu nennen: Der Pollenin Promotor (Karimi M 30 et al. (2002) J Nematol 34(2):75-79) sowie der Promotor einer putativen Rezeptor Serin/Threonin Proteinkinase (Custers JHHV et al. (2002) Mol Plant Pathol 3(4):239-249).

40 Besonders bevorzugt sind pathogen- oder stress-induzierbare, sowie Samen-, Knolle-, Wurzel-, Blatt- und/oder Stengel-spezifische, wobei pathogen-induzierbare (insbesondere die oben spezifisch genannten nematoden-induzierbaren Promotoren) am meisten bevorzugt sind.

45 Ein weiterer - besonders bevorzugter - Gegenstand der Erfindung betrifft Expressionskonstrukte, in denen eine Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Protein mit Saccharoseisomerase Aktivität in

funktioneller Verknüpfung mit einem stress-, pathogen-, oder verwundungs-induzierbaren Promotor steht. Stress-, pathogen oder verwundungs-induzierbare Promotoren meint allgemein all solche Promotoren, die durch biotischen oder abiotischen Stress 5 induziert werden können. Abiotischer Stress meint dabei Stimuli wie Hitze, Kälte, Trockenheit, Frost, Feuchte, Salz, UV-Licht usw. Biotischer Stress meint dabei den Befall durch ein Pathogen, wobei der Begriff "Pathogen" all die oben genannten Pathogene umfasst. Dabei hat der Stimulus bevorzugt eine Stärke, die zu 10 einem Ertragsrückgang von mindestens 5 % im Vergleich zu durchschnittlichen Ertragswerten führt. Induzierbar meint dabei eine Erhöhung der Transkriptionsaktivität um mindestens 50 %, bevorzugt mindestens 100 %, besonders bevorzugt mindestens 500 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 1000 %, am meisten bevorzugt 15 mindestens 5000 % im Vergleich zu der Expressionsaktivität einer nicht-stimulierten Pflanze. Stress- oder pathogen-induzierbare Promotoren umfassen beispielhaft, jedoch nicht einschränkend den pathogen-induzierbaren Promotor des PRP1-Gens (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), den hitzeinduzierbaren hsp70- oder 20 hsp80-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), den kälteinduzierbaren α -Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814), den licht-induzierbaren PPDK Promotor oder den verwundungs-induzierbaren pinII-Promoter (EP-A 0 375 091). Bevorzugt sind insbesondere pathogen-induzierbare Promotoren wie z.B. die Promotoren der 25 PR-Proteine, SAR-Proteine, β -1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) Neth J Plant Pathol 89:245-254; Uknas, et al. (1992) The Plant Cell 4:645-656; Van Loon (1985) Plant Mol Viral 4:111-116; Marineau et al. (1987) Plant Mol Biol 9:335-342; Matton et al. (1987) Molecular Plant-Microbe Interactions 2:325-342; Somssich et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:2427-2430; Somssich et al. (1988) Mol Gen Genetics 2:93-98; Chen et al. (1996) Plant J 10:955-966; Zhang and Sing (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:2507-2511; Warner, et al. (1993) Plant J 3:191-201; Siebertz et al. (1989) Plant Cell 1:961-968). Umfasst 30 35 sind auch verwundungs-induzierbare Promotoren wie der des pinII Gens (Ryan (1990) Ann Rev Phytopath 28:425-449; Duan et al. (1996) Nat Biotech 14:494-498), des wun1- und wun2-Gens (US 5,428,148), des win1- und win2-Gens (Stanford et al. (1989) Mol Gen Genet 215:200-208), des Systemin-Gens (McGurl et al. (1992) 40 Science 225:1570-1573), des WIP1-Gens (Rohmeier et al. (1993) Plant Mol Biol 22:783-792; Eckelkamp et al. (1993) FEBS Letters 323:73-76), des MPI-Gens (Corderok et al. (1994) Plant J 6(2):141-150) und dergleichen. Verwundungs-induzierbare Promotoren sind bei Befall durch Fraßpathogene vorteilhaft einzusetzen.

Der Durchschnittsfachmann kann darüber hinaus ohne weiteres zusätzliche Beispiele für Gene mit stress-, pathogen- oder verwundungs-induzierten Expressionsmustern der Literatur entnehmen. Ferner ist der Durchschnittsfachmann in der Lage, 5 mittels Routinemethoden weitere geeignete Promotoren zu isolieren. So kann der Fachmann mit Hilfe gängiger molekularbiologischer Methoden, z.B. Hybridisierungsexperimenten oder DNA-Protein-Bindungsstudien entsprechende regulatorische Nukleinsäureelemente identifizieren. Dabei wird z.B. in einem ersten 10 Schritt eine differentielle Expressionsbibliothek von beispielsweise pathogen-infizierten/befallenen und "normalem" Gewebe angelegt. Anschließend werden mit Hilfe der so identifizierten pathogen-induzierten cDNAs Promotoren isoliert, die über pathogen-induzierbare regulatorische Elemente verfügen. Dem Fachmann 15 stehen darüber hinaus weitere auf PCR basierende Methoden für die Isolierung geeigneter stress-, pathogen- oder verwundungs-induzierter Promotoren zur Verfügung.

Besonders bevorzugt sind gewebespezifische Promotoren, 20 insbesondere samenspezifische, knollenspezifische, fruchtspezifische und blattspezifische Promotoren sowie pathogen-induzierte Promotoren. Ganz besonders bevorzugt sind pathogeninduzierte Promotoren, insbesondere Nematoden-induzierte Promotoren.

25 Es können ferner weitere Promotoren funktionell mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz verknüpft sein, die eine transgene Expression in weiteren Pflanzengeweben oder in anderen Organismen, wie zum Beispiel *E.coli* Bakterien 30 ermöglichen. Als Pflanzenpromotoren kommen im Prinzip alle oben beschriebenen Promotoren in Frage.

Die in den Expressionskonstrukten oder Expressionsvektoren enthaltenen Nukleinsäuresequenzen können mit weiteren genetischen 35 Kontrollsequenzen neben einem Promoter funktionell verknüpft sein. Der Begriff der genetischen Kontrollsequenzen ist breit zu verstehen und meint all solche Sequenzen, die einen Einfluss auf das Zustandekommen oder die Funktion eines Expressionskonstruktes haben. Genetische Kontrollsequenzen modifizieren zum 40 Beispiel die Transkription und Translation in prokaryotischen oder eukaryotischen Organismen. Vorzugsweise umfassen die Expressionskonstrukte 5'-stromaufwärts von der jeweiligen transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz einen pflanzen-spezifischen Promoter und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz 45 als zusätzliche genetische Kontrollsequenz, sowie gegebenenfalls

weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils funktionell verknüpft mit der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz.

Genetische Kontrollsequenzen umfassen auch weitere Promotoren, 5 Promotorelemente oder Minimalpromotoren, die die expressionssteuernden Eigenschaften modifizieren können. So kann durch genetische Kontrollsequenzen zum Beispiel die gewebespezifische Expression zusätzlich abhängig von bestimmten Stressfaktoren erfolgen. Entsprechende Elemente sind zum Beispiel für Wasser- 10 stress, Abscisinsäure (Lam E und Chua NH (1991) J Biol Chem 266(26):17131- 17135) und Hitzestress (Schoffl F et al. (1989) Mol Gen Genetics 217(2-3):246-53) beschrieben.

Genetische Kontrollsequenzen umfassen ferner auch die 5'-untrans- 15 latierte Regionen, Introns oder nichtkodierende 3'-Region von Genen wie beispielsweise das Actin-1 Intron, oder die Adh1-S Introns 1, 2 und 6 (allgemein: The Maize Handbook, Chapter 116, Freeling and Walbot, Eds., Springer, New York (1994)). Es ist gezeigt worden, dass diese eine signifikante Funktionen bei 20 der Regulation der Genexpression spielen können. So wurde gezeigt, dass 5'-untranslatierte Sequenzen die transiente Expression heterologer Gene verstärken können. Beispielhaft für Translationsverstärker sei die 5'-Leadersequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus zu nennen (Gallie et al. (1987) Nucl Acids Res 15:8693-8711) und dergleichen. Sie können ferner die Gewebespezifität fördern (Rouster J et al. (1998) Plant J 15:435-440).

Das transgene Expressionskonstrukt kann vorteilhafterweise eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell ver- 30 knüpft mit dem Promoter enthalten, die eine erhöhte transgene Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden, wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die trans- 35 gen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

Als Kontrollsequenzen geeignete Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, 40 die im wesentlichen T-DNA Polyadenylierungssignale aus Agrobacterium tumefaciens umfassen. Beispiele für besonders geeignete Terminatorsequenzen sind der OCS (Octopin-Synthase)-Terminator und der NOS (Nopaline-Synthase)-Terminator.

45 Als Kontrollsequenzen sind weiterhin solche zu verstehen, die eine homologe Rekombination bzw. Insertion in das Genom eines Wirtsorganismus ermöglichen oder die Entfernung aus dem Genom

erlauben. Bei der homologen Rekombination kann zum Beispiel die kodierende Sequenz eines bestimmten endogenen Gens gegen die für eine Saccharoseisomerase kodierende Sequenz gezielt ausgetauscht werden..

5

Ein transgenes Expressionskonstrukt und/oder die von ihm abgeleiteten transgenen Expressionsvektoren können weitere Funktionselemente enthalten. Der Begriff Funktionselement ist breit zu verstehen und meint all solche Elemente, die einen Einfluss 10 auf Herstellung, Vermehrung oder Funktion der erfindungsgemäßen transgenen Expressionskonstrukte, der transgenen Expressionsvektoren oder der transgenen Organismen haben. Beispielhaft aber nicht einschränkend seien zu nennen:

15 a) Selektionsmarker, die eine Resistenz gegen Biozide z.B. Metabolismusinhibitoren (wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456), Antibiotika (wie z.B. Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin) oder Herbizide (wie Glyphosat oder Phosphinotricin) verleihen.

20

Besonders bevorzugte Selektionsmarker sind solche, die eine Resistenz gegen Herbizide verleihen. Beispielhaft seien genannt: DNA Sequenzen, die für Phosphinothricinacetyltransferasen (PAT) kodieren und Glutaminsynthaseinhibitoren 25 inaktivieren (bar und pat Gen), 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphatsynthasegene (EPSP Synthasegene), die eine Resistenz gegen Glyphosat® (N-(phosphonomethyl)glycin) verleihen, das für das Glyphosat® degradierende Enzyme kodierende gox Gen (Glyphosatoxidoreduktase), das deh Gen (kodierend für eine 30 Dehalogenase, die Dalapon inaktiviert), Sulfonylurea- und Imidazolinon inaktivierende Acetolactatsynthasen sowie bxn Gene, die für Bromoxynil degradierende Nitrilaseenzyme kodieren, das aasa-Gen, das eine Resistenz gegen das Antibiotikum Apectinomycin verleiht, das Streptomycinphosphotransferase (spt) Gen, das eine Resistenz gegen Streptomycin 35 gewährt, das Neomycinphosphotransferase (nptII) Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin oder Geneticin (G418) verleiht, das Hygromycinphosphotransferase (hpt) Gen, das eine Resistenz gegen Hygromycin vermittelt, das Acetolactatsynthase Gen (als), das eine Resistenz gegen Sulfonylharnstoff-Herbizide 40 verleiht (z.B. mutierte ALS-Varianten mit z.B. der S4 und/oder Hra Mutation)..

45

b) Reportergene, die für leicht quantifizierbare Proteine kodieren und über Eigenfarbe oder Enzymaktivität eine Bewertung der Transformationseffizienz oder des Expressionsortes oder -zeitpunktes gewährleisten. Ganz besonders

40

bevorzugt sind dabei Reporter-Proteine (Schenborn E, Groskreutz D. Mol Biotechnol. 1999; 13(1):29-44) wie das "green fluorescence protein" (GFP) (Sheen et al. (1995) Plant Journal 8(5):777-784), Chloramphenicoltransferase, 5 Luziferase (Ow et al. (1986) Science 234:856-859), Aequorin (Prasher et al. (1985) Biochem Biophys Res Commun 126 (3):1259-1268), β -Galactosidase, ganz besonders bevorzugt ist β -Glucuronidase (Jefferson et al. (1987) EMBO J 6:3901-3907).

10

c) Replikationsursprünge, die eine Vermehrung der erfindungsgemäßen transgenen Expressionskonstrukte oder transgenen Expressionsvektoren in zum Beispiel E.coli gewährleisten. Beispielhaft als ORI ("origin of DNA replication") seien 15 genannt der pBR322 ori oder der P15A ori (Sambrook et al.: Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

d) Elemente, die für eine Agrobakterium-vermittelte Pflanzentransformation erforderlich sind, wie zum Beispiel die 20 rechte oder linke Begrenzung der T-DNA oder die vir-Region.

Zur Selektion erfolgreich transformierter Zellen ist es in der Regel erforderlich, einen selektionierbaren Marker zusätzlich einzuführen, der den erfolgreich rekombinierten Zellen 25 eine Resistenz gegen ein Biozid (zum Beispiel ein Herbizid), einen Metabolismusinhibitor wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456) oder ein Antibiotikum verleiht. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion der transformierten Zellen von 30 untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84).

Die Einführung eines erfindungsgemäßen Expressionskonstrukt in einen Organismus oder Zellen, Geweben, Organe, Teile bzw. Samen 35 desselben (bevorzugt in Pflanzen bzw. pflanzliche Zellen, Gewebe, Organe, Teile oder Samen) kann vorteilhaft unter Verwendung von Vektoren realisiert werden, in denen die transgenen Expressionskonstrukte enthalten sind. Vektoren können beispielhaft Plasmide, Cosmide, Phagen, Viren oder auch Agrobakterien sein. Das trans- 40 gene Expressionskonstrukt kann in den Vektor (bevorzugt ein Plasmidvektor) über eine geeignete Restriktionsschnittstelle oder eine Rekombinase att-Sequenz eingeführt werden. Der entstandene transgene Expressionsvektor wird zunächst in E.coli eingeführt. Korrekt transformierte E.coli werden selektioniert, gezüchtet 45 und der rekombinante Vektor mit den dem Fachmann geläufigen Methoden gewonnen. Restriktionsanalyse und Sequenzierung können dazu dienen, den Klonierungsschritt zu prüfen. Bevorzugt sind

solche Vektoren, die eine stabile Integration des transgenen Expressionskonstruktes in das pflanzliche Genom ermöglichen.

Die Herstellung eines transformierten Organismus (bzw. einer transformierten Zelle oder Gewebes) erfordert, dass die entsprechende DNA (z.B. der Expressionsvektor) oder RNA in die entsprechende Wirtszelle eingebracht wird. Für diesen Vorgang, der als Transformation (oder Transduktion bzw. Transfektion) bezeichnet wird, steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung

5 (Keown et al. (1990) Methods in Enzymology 185:527-537). So kann die DNA oder RNA beispielhaft direkt durch Mikroinjektion oder durch Bombardierung mit DNA-beschichteten Mikropartikeln eingeführt werden. Auch kann die Zelle chemisch, zum Beispiel mit Polyethylenglycol, permeabilisiert werden, so dass die DNA durch

10 Diffusion in die Zelle gelangen kann. Die DNA kann auch durch Protoplastenfusion mit anderen DNA-enthaltenden Einheiten wie Minicells, Zellen, Lysosomen oder Liposomen erfolgen. Elektroporation ist eine weitere geeignete Methode zur Einführung von DNA, bei der die Zellen reversibel durch einen elektrischen

15 Impuls permeabilisiert werden. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (beispielsweise bei Bilang et al. (1991) Gene 100:247-250; Scheid et al. (1991) Mol Gen Genet 228:104-112; Guerche et al. (1987) Plant Science 52:111-116; Neuhouse et al. (1987) Theor Appl Genet 75:30-36; Klein et al. (1987) Nature 25 327:70-73; Howell et al. (1980) Science 208:1265; Horsch et al. (1985) Science 227:1229- 1231; DeBlock et al. (1989) Plant Physiology 91:694-701; Methods for Plant Molecular Biology (Weissbach and Weissbach, eds.) Academic Press Inc. (1988); and Methods in Plant Molecular Biology (Schuler and Zielinski, eds.)

20 Academic Press Inc. (1989)).

Bei Pflanzen werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind vor allem die Protoplasten-35 transformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone, die sogenannte "particle bombardment" Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung und

40 die Mikroinjektion.

Neben diesen "direkten" Transformationstechniken kann eine Transformation auch durch bakterielle Infektion mittels Agrobacterium tumefaciens oder Agrobacterium rhizogenes durchgeführt werden.

45 Die Agrobacterium-vermittelte Transformation ist am besten für dicotyledone Pflanzenzellen geeignet. Die Verfahren sind bei-

spielsweise beschrieben bei Horsch RB et al. (1985), Science 225: 1229f).

Werden Agrobakterien verwendet, so ist das transgene Expressionskonstrukt in spezielle Plasmide zu integrieren, entweder in einen Zwischenvektor (englisch: shuttle or intermediate vector) oder einen binären Vektor. Wird ein Ti oder Ri Plasmid zur Transformation verwendet, ist zumindest die rechte Begrenzung, meistens jedoch die rechte und die linke Begrenzung der Ti oder Ri Plasmid T-DNA als flankierende Region mit dem einzuführenden transgenen Expressionskonstrukt verbunden.

Bevorzugt werden binäre Vektoren verwendet. Binäre Vektoren können sowohl in E.coli als auch in Agrobacterium replizieren. Sie enthalten in der Regel ein Selektionsmarkergen für die Selektion transformierter Pflanzen (z.B. das nptII Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin verleiht) und einen Linker oder Poly-linker flankiert von der rechten und linken T-DNA Begrenzungssequenz. Außerhalb der T-DNA-Begrenzungssequenz enthalten sie zudem noch einen Selektionsmarker, der eine Selektion transformierter E.coli und/oder Agrobakteria ermöglicht (z.B. das nptIII Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin verleiht). Entsprechende Vektoren können direkt in Agrobakterium transformiert werden (Holsters et al. (1978) Mol Gen Genet 163:181-187).

Das in diesem Fall als Wirtsorganismus fungierende Agrobacterium sollte bereits ein Plasmid mit der vir-Region enthalten. Diese ist für die Übertragung der T-DNA auf die pflanzliche Zelle erforderlich. Ein so transformiertes Agrobacterium kann zur Transformation pflanzlicher Zellen verwendet werden. Die Verwendung von T-DNA zur Transformation pflanzlicher Zellen ist intensiv untersucht und beschrieben (EP 120 516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblaserdam, Chapter V; An et al. (1985) EMBO J 4:277-287). Verschiedene binäre Vektoren sind bekannt und teilweise kommerziell erhältlich wie zum Beispiel pBI101.2 oder pBIN19 (Clontech Laboratories, Inc. USA).

Direkte Transformationstechniken eignen sich für jeden Organismus und Zelltyp. Im Falle von Injektion oder Elektroporation von DNA bzw. RNA in pflanzliche Zellen werden keine besonderen Anforderungen an das verwendete Plasmid gestellt. Einfache Plasmide wie die der pUC-Reihe können verwendet werden. Sollen vollständige Pflanzen aus den transformierten Zellen regeneriert werden, so ist es vorteilhaft, wenn sich auf dem Plasmid ein zusätzliches selektionierbares Markergen befindet.

Stabil transformierte Zellen d.h. solche, die die eingeführte DNA integriert in die DNA der Wirtszelle enthalten, können von untransformierten selektioniert werden, wenn ein selektionierbarer Marker Bestandteil der eingeführten DNA ist. Als Marker kann beispielhaft jedes Gen fungieren, dass eine Resistenz gegen Antibiotika oder Herbizide (wie Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin oder Phosphinotricin etc.) zu verleihen vermag (s.o.). Transformierte Zellen, die ein solches Markergen exprimieren, sind in der Lage, in der Gegenwart von Konzentrationen eines entsprechenden Antibiotikums oder Herbizides zu überleben, die einen untransformierten Wildtyp abtöten. Beispiel sind oben genannt und umfassen bevorzugt das bar Gen, dass Resistenz gegen das Herbizid Phosphinotricin verleiht (Rathore KS et al. (1993) Plant Mol Biol 21(5):871-884), das nptII Gen, dass Resistenz gegen Kanamycin verleiht, das hpt Gen, das Resistenz gegen Hygromycin verleiht, oder das EPSP-Gen, das Resistenz gegen das Herbizid Glyphosat verleiht. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion von transformierten Zellen von untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84). Die erhaltenen Pflanzen können in üblicher Weise gezüchtet und gekreuzt werden. Zwei oder mehr Generationen sollten kultiviert werden, um sicherzustellen, dass die genomische Integration stabil und vererblich ist.

Die oben genannten Verfahren sind beispielsweise beschrieben in Jenes B et al. (1993) Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von SD Kung und R Wu, Academic Press, S.128-143 sowie in Potrykus (1991) Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol 42:205-225. Vorgezugsweise wird das Expressionskonstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al. (1984) Nucl Acids Res 12:8711f).

Sobald eine transformierte Pflanzenzelle hergestellt wurde, kann eine vollständige Pflanze unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren erhalten werden. Hierbei geht man beispielhaft von Kalluskulturen aus. Aus diesen noch undifferenzierten Zellmassen kann die Bildung von Spross und Wurzel in bekannter Weise induziert werden. Die erhaltenen Sprösslinge können ausgepflanzt und gezüchtet werden.

Dem Fachmann sind Verfahren bekannt, um aus Pflanzenzellen, Pflanzenteile und ganze Pflanzen zu regenerieren. Beispielsweise werden hierzu Verfahren beschrieben von Fennell et al. (1992) Plant Cell Rep. 11:567-570; Stoeger et al (1995) Plant Cell Rep.

44

14:273-278; Jahne et al. (1994) Theor Appl Genet 89:525-533 ver-
wendet..

"Transgen" meint alle solche Konstruktionen und Verfahren,
5 in denen sich entweder

- a) die Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Protein mit Saccharoseisomerase-Aktivität, oder
- 10 b) eine mit besagter Nukleinsäuresequenz unter a) funktionell verknüpfte genetische Kontrollsequenz, zum Beispiel ein Promotor, oder
- c) (a) und (b)

15

sich nicht in ihrer natürlichen, genetischen Umgebung befinden oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden, wobei die Modifikation beispielhaft eine Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer 20 Nukleotidreste sein kann. Natürliche genetische Umgebung meint den natürlichen chromosomal Locus in dem Herkunftsorganismus oder das Vorliegen in einer genomischen Bibliothek.

25

30

35

40

45

Sequenzen

1. SEQ ID NO: 1 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharose-isomerase aus *Protaminobacter rubrum*
- 5 2. SEQ ID NO: 2 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharose-isomerase aus *Protaminobacter rubrum*
- 10 3. SEQ ID NO: 3 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharose-isomerase aus Saccharoseisomerase aus *Erwinia rhabonthici* (N-terminales Fragment)
- 15 4. SEQ ID NO: 4 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharose-isomerase aus Saccharoseisomerase aus *Erwinia rhabonthici* (N-terminales Fragment)
5. SEQ ID NO: 5 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharose-isomerase aus *Erwinia rhabonthici*
- 20 6. SEQ ID NO: 6 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharose-isomerase aus *Erwinia rhabonthici*
7. SEQ ID NO: 7 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharose-isomerase aus *Protaminobacter rubrum* (Variante)
- 25 8. SEQ ID NO: 8 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharose-isomerase aus *Protaminobacter rubrum* (Variante)
9. SEQ ID NO: 9 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharose-isomerase aus *Enterobacter species SZ62*
- 30 10. SEQ ID NO: 10 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharose-isomerase aus *Enterobacter species SZ62*
- 35 11. SEQ ID NO: 11 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharose-isomerase aus *Serratia plymuthica*
12. SEQ ID NO: 12 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharose-isomerase aus *Serratia plymuthica*
- 40 45 13. SEQ ID NO: 13 Nukleinsäuresequenz kodierend für Fusionsprotein aus Saccharoseisomerase aus *Erwinia rhabonthici* (*palI*) und Signalpeptidsequenz des Proteinase Inhibitor II Gens

46

14. SEQ ID NO: 14 Aminosäuresequenz kodierend für Fusionsprotein aus Saccharoseisomerase aus *Erwinia rhabontici* (*pall*) und Signalpeptidsequenz des Proteinase Inhibitor II Gens

5

15. SEQ ID NO: 15 Nukleinsäuresequenz (vollständige cDNA mit untranslatierter Region) kodierend für Saccharoseisomerase (Isomaltulosesynthase) aus *Klebsiella* sp. LX3

10

16. SEQ ID NO: 16 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharoseisomerase (Isomaltulosesynthase) aus *Klebsiella* sp. LX3

15 17. SEQ ID NO: 17 Nukleinsäuresequenz (offenes Leseraster) kodierend für Saccharoseisomerase (Isomaltulosesynthase) aus *Klebsiella* sp. LX3

18. SEQ ID NO: 18 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharoseisomerase (Isomaltulosesynthase) aus *Klebsiella* sp. LX3

20

19. SEQ ID NO: 19 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharoseisomerase aus *Enterobacter* species SZ62 (Fragment)

25

20. SEQ ID NO: 20 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharoseisomerase aus *Enterobacter* species SZ62 (Fragment)

30

21. SEQ ID NO: 21 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharoseisomerase aus *Pseudomonas mesoacidophila* MX45 (Fragment)

35 22. SEQ ID NO: 22 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharoseisomerase aus *Pseudomonas mesoacidophila* MX45 (Fragment)

40

23. SEQ ID NO: 23 Nukleinsäuresequenz kodierend für Lemmi9-Promotor aus Tomate (*Lycopersicum esculatum*)

45

24. SEQ ID NO: 24 Nukleinsäuresequenz kodierend für $\Delta 0.3$ TobRB7 Promotorsequenz (Region: -298 bis +76) aus *Nicotiana tabacum*

47

25. SEQ ID NO: 25 Oligonukleotidprimer FB83
5'-GGATCCGGTACCGTTCAGCAATCAAAT-3'

26. SEQ ID NO: 26 Oligonukleotidprimer FB84
5'-GTCGACGTCTGCCAAAAACCTT-3'

27. SEQ ID NO: 27 Oligonukleotidprimer FB 97
5'-GTCGACCTACGTGATTAAGTTTATA-3'

10 28. SEQ ID NO: 28 Oligonukleotidprimer Lem1
5'-atcGAATTCTATAATTAAACCATCTAGAG-3'

15 29. SEQ ID NO: 29 Oligonukleotidprimer Lem2
5'-atcGGTACCTGCTTCTGGAACGAAAGGG-3'

30. SEQ ID NO: 30 Oligonukleotidprimer Tob1
5'-GGAATTCAAGCTTATCTAAACAAAGTTTAAATTC-3'

20 31. SEQ ID NO: 31 Oligonukleotidprimer Tob2
5'-GGGTACCAAGTTCTCACTAGAAAAATGCC-3'

32. SEQ ID NO: 32 Nukleinsäuresequenz kodierend für V-sense
Promotor aus Wheat Dwarf Virus (GenBank Acc.-
No.: AX006849; Sequenz 1 aus WO 00/01832)

25 33. SEQ ID NO: 33 Nukleinsäuresequenz kodierend für V-sense
Promotor aus Maize Streak Virus (GenBank Acc.-
No.: AX006850; Sequenz 2 aus WO 00/01832)

30 34. SEQ ID NO: 34 Nukleinsäuresequenz kodierend für V-sense
Promotor aus Pepper huasteco Virus (GenBank
Acc.-No.: AX006851; Sequenz 3 aus WO 00/01832)

35 35. SEQ ID NO: 35 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharose-
isomerase aus Serratia plymuthica

36. SEQ ID NO: 36 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharose-
isomerase aus Serratia plymuthica

40

45

Abbildungen

1. Fig. 1: Schematische Darstellung der Expressionskassette im Plasmid p35S-cwIso. Bedeutung der Abkürzungen:
5 35S: 35S Cauliflower Mosaik Virus (CaMV) Promotor
SP: Signalpeptid des Proteinase-Inhibitor II-Gens
palI: Saccharoseisomerase Gen aus *Erwinia rhamphontici*
OCS: Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens
EcoRI, Asp718, BamHI, SalI, HindIII: Restriktionschnittstellen
10 Detaillierte Beschreibung der einzelnen Elemente siehe unten.
2. Fig 2: Schematische Darstellung der Expressionskassette im Plasmid pB33-cwIso. Bedeutung der Abkürzungen:
15 B33: Promotor des Klasse I Patatin-Gens B33
SP: Signalpeptid des Proteinase-Inhibitor II-Gens
palI: Saccharoseisomerase Gen aus *Erwinia rhamphontici*
OCS: Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens
EcoRI, Asp718, BamHI, SalI, HindIII: Restriktionschnittstellen
Detaillierte Beschreibung der einzelnen Elemente siehe unten.
20
3. Fig. 3: Westernblot-Analyse von palI exprimierenden Kartoffelknollen verschiedener transgener Linien. Pro Spur wurden 20 µg lösliches Protein auf ein SDS-Gel aufgetragen, getrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Der Filter wurden anschließend mit einem polyklonalen PalI Antikörper hybridisiert. Verglichen wurde die Expression in Knollen von Wildtyp-Kartoffelpflanzen (wt) mit der in den Kartoffellinien 5, 12, 26 und 33.
25
- 30 4. Fig. 4: HPLC-Analyse der löslichen Kohlenhydrate in Saccharoseisomerase exprimierenden Pflanzen.
A: Zuckerstandards.
B: Extrakt einer transgenen Knolle.
C: Extrakt einer Wildtypknolle.
35
5. Fig. 5: Gehalt an Palatinose, Saccharose, Glucose und Stärke in Wildtyp-Kartoffelknollen (wt) und Kartoffelknollen verschiedener transgener Linien (3 bis 37), die das chimäre palI Gen in der Zellwand exprimieren. Die Werte des Wildtyps (wt; gestreifte Säulen) und der transgenen Kartoffelknollen (3 bis 37; schwarze Säulen) entsprechen den Mittelwerten von vier Messungen ± Standardabweichung. Als zusätzliche Kontrolle wurde eine transgene jedoch palI nicht-exprimierende Linie (Control) analysiert.
40
45

6. Fig. 6: Infektion von Kartoffelknollen mit *Alternaria solani*. Kartoffelscheiben von Wildtyp-Knollen und Knollen der *pali* exprimierenden transgenen Lинien 5 und 33 zum Zeitpunkt 14 Tage nach Infektion mit *Alternaria solani*.

5 A: Kontrolle mit Kartoffelscheiben von Wildtyp (wt)- und transgenen Knollen (Linien 5 und 33) nach 14-tägiger Inkubation ohne vorherige *Alternaria* Infektion.

B: Wildtypknollen; 14 Tage nach *Alternaria* Infektion

C: Transgene Linie-5; 14 Tage nach *Alternaria* Infektion

10 D: Transgene Linie-33; 14 Tage nach *Alternaria* Infektion

7. Fig. 7: Schematische Darstellung der Expressionskassette im Plasmid pLemmi9-cwIso. Bedeutung der Abkürzungen:
 Lemmi9: Lemmi9-Promotor aus Tomate (*Lycopersicon esculentum*)
 15 SP: Signalpeptid des Proteinase-Inhibitor II-Gens
 pali: Saccharoseisomerase Gen aus *Erwinia rhamphontici*
 OCS: Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens
 EcoRI, Asp718, BamHI, SalI, HindIII: Restriktionschnittstellen
 Detaillierte Beschreibung der einzelnen Elemente siehe unten.

20 8. Fig 8: Schematische Darstellung der Expressionskassette im Plasmid pΔ0.3TobRB7-cwIso. Bedeutung der Abkürzungen:
 Δ0.3TobRB: Δ0.3TobRB7-Promotor aus *Nicotiana tabacum*
 SP: Signalpeptid des Proteinase-Inhibitor II-Gens
 25 pali: Saccharoseisomerase Gen aus *Erwinia rhamphontici*
 OCS: Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens
 EcoRI, Asp718, BamHI, SalI, HindIII: Restriktionschnittstellen
 Detaillierte Beschreibung der einzelnen Elemente siehe unten.

30 Beispiele

Allgemeine Methoden:

Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, 35 in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeföhrten Klonierungsschritte - wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarosegelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren 40 auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *E. coli* Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA - werden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeföhrt. 45 Die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* wurde entsprechend der Methode von Hofgen und Willmitzer ((1988) Nucl. Acids Res. 16:9877) ausgeführt. Die Anzucht der Agrobakterien erfolgte

50

in YEB Medium (Vervliet et al. (1975) Gen Virol 26:33). Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgt mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma MWG-Licor nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc Natl Acad 5 Sci USA 74:5463-5467)..

Beispiel 1: PCR-Amplifikation eines Subfragments der Saccharoseisomerase aus *Erwinia rhabonitici*

10 Die Klonierung eines Subfragments der Saccharoseisomerase erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR). Als Matrizenmaterial diente genomische DNA aus *E. rhabonitici* (DSM 4484), die nach Standardprotokoll isoliert wurde. Die Amplifizierung erfolgte unter Verwendung der nach-15 folgenden spezifischen Primer, die von einer Saccharoseisomerase-Sequenz des Standes der Technik abgeleitet wurden:

FB83 5'-GGATCCGGTACCGTTCAGCAATCAAAT-3' (SEQ ID NO: 25)

20 FB84 5'-GTCGACGTCTTGCCAAAAACCTT-3' (SEQ ID NO: 26)

Primer FB83 umfaßt die Basen 109 bis 127 und Primer FB84 die Basen 1289 bis 1306 der kodierenden Region des Saccharoseisomerase-Gens von *E. rhabonitici*.

25

Das PCR-Reaktionsgemisch (100 µl) enthielt:

30

- chromosomale Bakterien DNA (1 µg)
- Primer FB 83 und FB 84 (jeweils 250 ng),
- Pfu DNA-Polymerase-Reaktionspuffer (10 µl, Stratagene),
- 200 µM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und
- 2,5 Einheiten Pfu DNA-Polymerase (Stratagene).

Vor Beginn der Amplifikationszyklen wurde das Gemisch für 5 min 35 auf 95°C erhitzt. Die Polymerisierungsschritte (30 Zyklen) wurden in einem automatischen T3-Thermocycler (Biometra) nach folgendem Programm durchgeführt: Denaturierung 95°C (1 Minute), Anlagerung der Primer bei 55°C (40 Sekunden), Polymerase-Reaktion bei 72°C (2 Minuten). Das erhaltene Fragment wurde in den Vektor pCR-Blunt 40 (Invitrogen) kloniert. Die Identität der amplifizierten DNA wurde mittels Sequenzanalyse verifiziert.

Das amplifizierte Subfragment kann auch als Hybridisierungssonde für die Isolierung weiterer Saccharoseisomerase-DNA-Sequenzen 45 aus anderen Organismen oder als Sonde bei der Analyse transgener Zellen und Pflanzen eingesetzt werden.

Beispiel 2: PCR-Amplifikation einer Saccharoseisomerase aus *Erwinia rhabonitici*

Unter Verwendung des in Beispiel 1 amplifizierten Fragmentes 5 wurde eine genomische Bank von *Erwinia rhabonitici* nach Standardmethoden durchmustert. Anschließende Sequenzanalysen erlaubten die Bestimmung des offenen Leserahmens der Saccharoseisomerase. Von dieser Sequenz wurden die Oligonukleotidprimer FB83 und FB97 abgeleitet.

10

Die Klonierung des vollständigen offenen Leserasters der Saccharose-Isomerase erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR). Als Matrizenmaterial diente 15 genomische DNA aus *E. rhabonitici* (DSM 4484), die nach Standardprotokoll isoliert wurde. Die Amplifizierung erfolgte unter Verwendung der nachfolgenden spezifischen Primer

FB83 5'-GGATCCGGTACCGTTCAGCAATCAAAT-3' (SEQ ID NO: 25)

20 FB97 5'-GTCGACCTACGTGATTAAGTTTATA-3' (SEQ ID NO: 27)

Primer FB83 umfaßt die Basen 109 bis 127 und Primer FB97 die 25 Basen 1786 bis 1803 der kodierenden Region des Saccharose-isomerase-Gens. Zur Klonierung der amplifizierten DNA in Expressionsvektoren tragen die Primer zusätzlich folgende Restriktionschnittstellen: Primer FB 83, BamHI und Primer FB 97, SalI.

Das PCR-Reaktionsgemisch (100 µl) enthielt:

30

- chromosomal Bakterien-DNA (1 µg),
- Primer FB83 und FB97 jeweils 250 ng,
- Pfu DNA-Polymerase-Reaktionspuffer (10 µl Stratagene),
- 200 µM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und
- 35 - 2,5 Einheiten Pfu DNA-Polymerase (Stratagene).

Vor Beginn der Amplifikationszyklen wurde das Gemisch für 5 min auf 95°C erhitzt. Die Polymerisierungsschritte (30 Zyklen) wurden 40 in einem automatischen T3-Thermocycler (Biometra) nach folgendem Programm durchgeführt: Denaturierung 95°C (1 Minute), Anlagerung der Primer bei 55°C (40 Sekunden), Polymerase-Reaktion bei 72°C (2 Minuten). Das amplifizierte Saccharoseisomerase-Fragment wurde in den Vektor pCR-Blunt (Invitrogen) kloniert, wodurch das Plasmid pCR-SucIso2 (ohne Translationsstart) erhalten wurde. 45 Die Identität der amplifizierten DNA wurde mittels Sequenzanalyse verifiziert. Das PCR-Fragment beinhaltet somit die Sequenz einer

Saccharoseisomerase aus *E. rhabontici*, die sich von Nukleotid 109-1803 des Saccharoseisomerase-Gens erstreckt.

Beispiel 3: Herstellung von Plasmid p35S-cwIso

5

Eine DNA Sequenz, die für eine Saccharose-Isomerase kodiert, wurde aus dem Plasmid pCR-SucIso2 isoliert und mit dem 35S-Promotor des Cauliflower Mosaik Virus, der eine konstitutive Expression in transgenen Pflanzenzellen vermittelt sowie 10 einem pflanzlichen Terminationssignal versehen. Das pflanzliche Terminationssignal beinhaltet das 3'-Ende der Polyadenylierungsstelle des Octopin-Synthase Gens.

Vor die kodierende Sequenz des Saccharoseisomerase-Gens wurde 15 außerdem ein für die Aufnahme in das Endoplasmatische Retikulum notwendiges Signalpeptid eines pflanzlichen Gens (Proteinase-Inhibitor II-Gen aus Kartoffel (Keil et al. (1986) Nucl Acids Res 14:5641-5650; Genbank Acc.-No.: X04118) fusioniert. Dazu wurde 20 das Saccharoseisomerase-Fragment aus dem Konstrukt pCR-SucIso2 über die Restriktionsschnittstellen BamHI und SalI herausgeschnitten und in einen BamHI/SalI-geöffneten pMA-Vektor ligiert. Der Vektor pMA stellt eine modifizierte Form des Vektors pBinAR (Höfgen und Willmitzer (1990) Plant Sci. 66:221-230) dar. Welche 25 den 35S-Promotor des Cauliflower Mosaik Virus, der eine konstitutive Expression in transgenen Pflanzen vermittelt, ein Signalpeptid des Proteinase-Inhibitors II aus Kartoffel, welches die Zielsteuerung des Fusionsproteins in die Zellwand vermittelt, sowie ein pflanzliches Terminationssignal enthält. Das pflanzliche 30 Terminationssignal beinhaltet das 3'-Ende der Polyadenylierungsstelle des Octopin-Synthase Gens. Zwischen der Teilsequenz des Proteinase-Inhibitors und dem Terminationssignal befinden sich Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BamHI, XbaI, SalI, PstI und SphI (in dieser Reihenfolge), welche die Insertion entsprechender DNA-Fragmente ermöglichen, so dass ein Fusionprotein zwischen dem Proteinase-Inhibitor Signalpeptid und dem 35 eingefügten Protein entsteht, welches dann in die Zellwand von transgenen Pflanzenzellen befördert wird, die dieses Protein exprimieren. Die Expressionskassette im Plasmid p35S-cwIso besteht somit aus den Fragmenten A, B und C (Fig. 1):

40

A) Fragment A beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower Mosaik Virus (CaMV). Es enthält ein Fragment, welches die Nukleotide 6909 bis 7437 des CaMV umfaßt (Franck (1980) Cell 21:285).

45

B) Fragment B enthält die Nukleotide 923 bis 1059 eines Proteinase-Inhibitor II-Gens aus der Kartoffel (Keil et al., supra), welche über einen Linker mit der Sequenz ACC GAA TTG GG an das Saccharoseisomerase Gen aus *Erwinia rhabontici*, welches die Nukleotide 109 bis 1803 umfaßt, fusioniert sind. Dadurch wird ein für die Aufnahme von Proteinen in das Endoplasmatische Retikulum (ER) notwendige Signalpeptid eines pflanzlichen Proteins N-terminal an die Saccharoseisomerase Sequenz fusioniert.

C) Fragment C enthält das Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens (Dhaese et al. (1983) EMBO J. 2:419-426. GenBank Acc.-No.: Z37515, Nukleotide 1344 bis 1533).

In p35S-cwIso (35S = 35S-Promotor, cw = Zellwand, Iso = Saccharoseisomerase) steht die kodierende Region der Saccharoseisomerase aus *E. rhabontici* unter konstitutiver Kontrolle, das Genprodukt wird in das ER aufgenommen und anschließend sekretiert.

Beispiel 4: Herstellung von Plasmid pB33-cwIso

Das Plasmid pB33-cwIso wurde unter Verwendung des binären Plasmids p35S-cwIso hergestellt. Dabei wurde der 35S-Promoter gegen den Promotor des Klasse I Patatin-Gens (Rocha-Sosa et al (1989) EMBO J 8:23-29) ausgetauscht. Die Expressionskassette dieses Plasmids pB33-cwIso besteht somit aus den drei Fragmenten A, B und C (siehe Fig. 2):

A) Fragment A beinhaltet die Region -1512 bis +14 relativ zur Transkriptionsinitiationsstelle des Klasse I Patatin-Gens. Die Promotorregion wurde als DraI-Fragment in den mit SstI geschnittenen Vektor pUC18, dessen Enden unter Einsatz der T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und somit geglättet worden waren, ligiert. Anschließend wurde das Fragment mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Asp718 aus dem Vektor pUC18 wieder ausgeschnitten und in das Plasmid p35S-cwIso kloniert, aus dem vorher der 35S CaMV-Promotor nach partieller Restriktion mit den Enzymen EcoRI und Asp718 deletiert worden war.

B) Fragment B enthält die Nukleotide 923 bis 1059 eines Proteinase-Inhibitor II-Gens aus der Kartoffel, welche über einen Linker mit der Sequenz ACC GAA TTG GG an das Saccharoseisomerase-Gen aus *E. rhabontici*, welches die Nukleotide 109 bis 1803 umfasst, fusioniert sind. Dadurch wird ein für die Aufnahme von Proteinen in das ER notwendiges

Signalpeptid eines pflanzlichen Proteins N-terminal an die Saccharoseisomerase-Sequenz fusioniert.

5 C) Fragment C enthält das Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens (Dhaese et al. (1983) EMBO J 2:419-426; GenBank Acc.-No.: Z37515, Nukleotide 1344 bis 1533).

10 In pB33-cwIso (B33 = Promotor des Klasse I Patatin-Gens B33, cw = Zellwand, Iso = Saccharoseisomerase) steht die kodierende Region der Saccharoseisomerase aus *E. rhabontici* unter gewebe-spezifischer Kontrolle, das Genprodukt wird in das ER aufgenommen.

15 Beispiel 5: Kartoffeltransformation und Selektion transgener Pflanzen

20 kleine, mit einem Skalpell verwundete Blätter einer Kartoffel-Sterilkultur (*Solanum tuberosum* L. cv. Solara) wurden in 10 ml MS-Medium mit 2 % Saccharose gelegt, welches 50 µl einer unter 20 Selektion gewachsenen *Agrobacterium tumefaciens*-Übernachtkultur enthielt. Nach 5-minütigem, leichtem Schütteln wurden die Petrischalen bei 25°C im Dunkeln inkubiert. Nach zwei Tagen wurden die Blätter auf MS-Medium mit 1,6 % Glucose, 2 mg/l Zeatinribose, 0,02 mg/l Gibberellinsäure, 500 mg/l Claforan, 50 mg/l Kanamycin 25 und 0,8 % Bacto-Agar ausgelegt. Nach einwöchiger Inkubation bei 25°C und 3000 Lux wurde die Claforankonzentration im Medium halbiert. Eine weitere Woche Kultivierung erfolgte unter bekannten Bedingungen (Rocha-Sosa et al. (1989) EMBO J 8:23-29).

30 Unter Verwendung des pB33-cwIso Plasmids wurden nach Agrobakterien-vermittelter Transformation insgesamt 36 kanamycin-resistente Kartoffelpflanzen regeneriert. Die Knollen dieser Pflanzen wurden mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers gegen das rekombinante PalI Protein (Börnke et al. (2002) 35 *Planta* 214:356-364) auf palI Expression untersucht. Bei 25 Linien konnte palI Expression im Westernblot nachgewiesen werden. Ein Westernblot von repräsentativen Linien ist in Fig. 3 dargestellt.

40 Beispiel 6: HPLC-Analyse der transgenen pB33-cwIso-Kartoffeln

Mit dem Ziel des Nachweises der *in vivo* Konversion von Saccharose in Palatinose wurden Knollenextrakte der transgenen Linien mittels HPLC hinsichtlich ihres Gehaltes an löslichen Kohlenhydraten untersucht. Die HPLC Analyse wurde nach der in Börnke et al. (2002) *Planta* 214:356-364 beschrieben Methode durchgeführt. Die Herstellung der Knollen Extrakte ist beschrieben

bei Sonnewald et al. (1992) Plant J 2:571-581. Die Resultate der HPLC Analyse sind in Fig. 4 dargestellt.

Wie die Chromatogramme zeigen, führt die Expression der Saccharoseisomerase in der Zellwand zu einer substantiellen Akkumulation von Palatinose in den Knollen der untersuchten pB33-cwIso-Linien. Der Wildtyp enthält keine Palatinose, wie ebenfalls aus den Chromatogrammen deutlich zu erkennen ist. Der Gehalt an löslichen Zuckern in transgenen Kartoffelknollen, die das Konstrukt pB33-cwIso enthalten, ist in Fig. 5 dargestellt. Der Gehalt an Palatinose in den Kartoffelknollen variiert zwischen den einzelnen transgenen Linien zwischen 1,7 µmol/g FW (FW: "fresh weight" = Frischgewicht) (Linie 14) und 16 µmol/g FW (Linie 5).

15

Beispiel 7: Infektion von Kartoffelscheiben mit Alternaria solani

Alternaria solani (bereitgestellt von Dr. Jürgen Sigrist, Zentrum für Grüne Gentechnik, Neustadt an der Weinstraße) wurden auf PDA-Agar (Duchefa, Niederlande) für 14 Tage bei 16°C gehalten (PDA = Potato Dextrose Agar). Die Sporen wurden durch Abschaben in Wasser isoliert und die erhaltene Suspension durch Miracloth von festen Bestandteilen befreit. Die Sporeanzahl wurde in einer Zählkammer (Thoma) bestimmt und auf 10000 Sporen/ml eingestellt. 25 µl (demnach 250 Sporen) wurden pro Kartoffelscheibe (1,5 cm Durchmesser) aufgetragen und gleichmäßig verteilt. Die inkulierten Scheiben wurden anschließend bei 16°C inkubiert. Die Bonitur erfolgte optisch. Das Ergebnis nach 14-tägiger Inkubation ist in Fig. 6 dargestellt. Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, ist das Wachstum des Pilzes auf transgenen Kartoffelknollen, die die Saccharoseisomerase exprimieren im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert.

35

Beispiel 8: Herstellung des Plasmids pLemmi9-cwIso

Zur Herstellung des Plasmids pLemmi9-cwIso wurde der Promotor des Klasse I Patatin-Gens B33 im Plasmid pB33-cwIso gegen den Lemmi9 Promotor Escobar et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:440-449 ausgetauscht und das Fusionsprotein aus Proteinase-Inhibitor II-Signalpeptid und der Saccharoseisomerase somit unter die Kontrolle des "Feeding cell"-spezifischen Promotor gestellt.

Die Funktionalität des "Feeding cell"-spezifischen Lemmi9-Promotors wurde bereits demonstriert (Escobar C et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:440-449). Das Plasmid pLemmi9-cwIso beinhaltet drei Fragmente A, B und C (siehe Fig. 7):

5 A) Fragment A beinhaltet den Lemmi9-Promotor aus Tomate (*Lycopersicon esculentum*). Das Fragment beinhaltet die Sequenz von 1417 bp vor dem Translationsstart (ATG) des Lemmi9-Gens und wurde als funktionelles Promoterfragment charakterisiert (Escobar et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12: 440-449, Accession Z69032). Es wurde mittels PCR aus 10 genomischer DNA von Tomate (*Lycopersicon esculentum*) amplifiziert. Die Amplifizierung erfolgte unter Verwendung der folgenden spezifischen Primer:

10 Lem1: 5'atcGAATTCTATAATTTAACCATCTAGAG 3' (SEQ ID NO: 28)

Lem2: 5'atcGGTACCTGCTTCTGGAACGAAAGGG 3' (SEQ ID NO: 29)

15 Zur Klonierung der DNA in die Expressionskassette tragen die Primer zusätzlich folgende Restriktionsschnittstellen: Primer Lem1, EcoRI; Primer Lem2, Asp718.

20 Das PCR-Reaktionsgemisch (100 µl) enthielt:

25 - genomische Tomaten-DNA (1 µg),
- Primer Lem1 und Lem2 (jeweils 250 ng),
- Pfu DNA-Polymerase-Reaktionspuffer (10 µl, Stratagene),
- 200 µM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und
- 2,5 Einheiten Pfu DNA-Polymerase (Stratagene).

30 Vor Beginn der Amplifikationszyklen wurde das Gemisch für 5 min auf 95°C erhitzt. Die Polymerisierungsschritte (30 Zyklen) wurden in einem automatischen T3-Thermocycler (Biometra) nach folgendem Programm durchgeführt: Denaturierung 95°C (1 Minute), Anlagerung der Primer bei 56°C (40 Sekunden), Polymerase-Reaktion bei 72°C (3 Minuten). Das Amplikon wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Asp718 verdaut und in die entsprechenden Restriktions-35 schnittstellen des Polylinkers von pBluescript (Stratagene) kloniert. Die Identität der amplifizierten DNA wurde mittels Sequenzanalyse verifiziert. Anschließend wurde das Fragment mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Asp718 verdaut und 40 in das Plasmid pB33-cwIso kloniert aus dem vorher der B33-Promotor nach partieller Restriktion mit den Enzymen EcoRI und Asp718 deletiert wurde.

45 B) Fragment B enthält die Nukleotide 923 bis 1059 des Proteinase-Inhibitor II-Gens aus der Kartoffel (Keil et al. (1986) Nucl Acids Res 14:5641-5650; Genbank Acc.No.: X04118), welche über einen Linker mit der Sequenz ACC GAA TTG GG an das Saccharoseisomerase-Gen aus *E. rhabontici*, welches die

Nukleotide 109 bis 1803 umfasst, fusioniert sind. Dadurch ist ein für die Aufnahme von Proteinen in das ER notwendiges Signalpeptid eines pflanzlichen Proteins N-terminal an die Saccharoseisomerase-Sequenz fusioniert.

5

C) Fragment C enthält das Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens (Dhaese et al. (1983) EMBO J 2:419-426. Accession Z37515, Nukleotide 1344 bis 1533)..

10 In pLemmi9-cwIso (Lemmi9 = Promotor des Lemmi9-Gens aus Tomate (*Lycopersicon esculentum*), cw = Zellwand, Iso = Saccharose-isomerase) steht die kodierende Region des Saccharoseisomerase-Gens unter Feeding cell-spezifischer Kontrolle, das Genprodukt wird in das ER aufgenommen.

15

Analog wurde ein Kontrollkonstrukt zur Expression von β -Glucuronidase (Jefferson et al. (1987) EMBO J 6:3901-3907) unter Kontrolle des Lemmi9-Promotors hergestellt (pLemmi9-GUS).

20 Kartoffelzellen wurden wie oben beschrieben mittels Agrobacterium-vermitteltem Gentransfer mit dem Konstrukt pLemmi9-cwIso bzw. pLemmi9-GUS transformiert und ganze Kartoffelpflanzen wurden regeneriert.

25 Beispiel 9: Herstellung des Plasmids p Δ 0.3TobRB7-cwIso

Zur Herstellung des Plasmids p Δ 0.3TobRB7-cwIso wurde der Promotor des Klasse I Patatin-Gens B33 im Plasmid pB33-cwIso gegen den Δ 0.3TobRB7 Promotor (Opperman et al. (1994) Science 263:221-223)

30 ausgetauscht und das Fusionsprotein aus Proteinase-Inhibitor-Signalpeptid und der Saccharoseisomerase somit unter Feeding cell-spezifische Kontrolle gestellt.

Die Funktionalität des "Feeding cell"-spezifischen Δ 0.3TobRB7-

35 Promotors wurde bereits demonstriert (Opperman et al. (1994) Science 263:221-223). Das pflanzliche Terminationssignal beinhaltet das 3'-Ende der Polyadenylierungsstelle des Octopin-Synthase-Gens. Das Plasmid p Δ 0.3TobRB7-cwIso beinhaltet drei Fragmente A, B und C (Fig. 8):

40

A) Fragment A beinhaltet den Δ 0.3TobRB7-Promotor aus *Nicotiana tabacum*. Das Fragment beinhaltet die Region von -298 bp bis +76 des TobBR7-Gens befinden und als funktionelles Promotorfragment charakterisiert wurden (Opperman et al. (1994) Science. 263: 221-223, Acc.-No.: S45406) . Es wurde mittels PCR aus genomischer DNA von *Nicotiana tabacum* Var. Samsun NN

amplifiziert. Die Amplifizierung erfolgte unter Verwendung der folgenden spezifischen Primer:

Tob1: 5'-GGAATTCAGCTTATCTAACAAAGTTTAAATTC-3' (SEQ ID NO: 30)

5

Tob2: 5'-GGGTACCAAGTTCTCACTAGAAAAATGCC-3' (SEQ ID NO: 31)

10 Zur Klonierung der DNA in die Expressionskassette tragen die Primer zusätzlich folgende Restriktionsschnittstellen: Primer Tob1, EcoRI; Primer Tob2, Asp718.

Das PCR-Reaktionsgemisch (100 µl) enthielt:

15

- genomische DNA aus Tabak (1 µg),
- Primer Tob1 und Tob2 (jeweils 250 ng),
- Pfu DNA-Polymerase-Reaktionspuffer (10 µl, Stratagene),
- 200 µM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und
- 2,5 Einheiten Pfu DNA-Polymerase (Stratagene).

20 Vor Beginn der Amplifikationszyklen wurde das Gemisch für 5 min auf 95°C erhitzt. Die Polymerisierungsschritte (30 Zyklen) wurden in einem automatischen T3-Thermocycler (Biometra) nach folgendem Programm durchgeführt: Denaturierung 95°C (1 Minute), Anlagerung der Primer bei 56°C (40 Sekunden), Polymerase-Reaktion bei 72°C (3 Minuten).

25 Das Amplikon wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Asp718 verdaut und in die entsprechenden Restriktions- schnittstellen des Polylinkers von pBluescript (Stratagene) kloniert. Die Identität der amplifizierten DNA wurde mittels 30 Sequenzanalyse verifiziert. Anschließend wurde das Fragment mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Asp718 verdaut und in das Plasmid pB33-cwIso kloniert aus dem vorher der B33-Promotor nach Restriktion mit den Enzymen EcoRI und Asp718 deletiert wurde.

35

B) Fragment B enthält die Nukleotide 923 bis 1059 eines Proteinase-Inhibitor II-Gens aus der Kartoffel (Keil et al. (1986) Nucl. Acids Res. 14:5641-5650; Genbank Acc.No.: X04118), welche an das Saccharoseisomerase-Gen aus *E. rhapontici*, welches die Nukleotide 109 bis 1803 umfasst, fusioniert sind. Dadurch wird ein für die Aufnahme von Proteinen in das ER notwendiges Signalpeptid eines pflanzlichen Proteins N-terminal an die Saccharoseisomerase-Sequenz fusioniert.

45

C) Fragment C enthält das Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens (Dhaese et al. (1983) EMBO J 2:419-426. Accession Z37515, Nukleotide 1344 bis 1533).

5 In pΔ0.3TobRB7-cwIso (Δ0.3TobRB7 = verkürzter Promotor des TobRB7-Gens aus Tabak, cw = Zellwand, Iso = Saccharoseisomerase) steht die kodierende Region des Saccharoseisomerase-Gens unter "Feeding cell"-spezifischer Kontrolle, das Genprodukt wird in das ER aufgenommen.

10 Analog wurde ein Kontrollkonstrukt zur Expression von β -Glucuronidase (Jefferson et al. (1987) EMBO J 6:3901-3907) unter Kontrolle des Δ0.3TobRB7-Promotors hergestellt (pΔ0.3TobRB7-GUS).

15 Kartoffelzellen wurden wie oben beschrieben mittels Agrobacterium-vermitteltem Gentransfer mit dem Konstrukt pΔ0.3TobRB7-cwIso bzw. pΔ0.3TobRB7-GUS transformiert und Kartoffelpflanzen wurden regeneriert

20 Beispiel 10: Infektion der Pflanzen mit Nematoden

Transformierte Pflanzen werden mit Hilfe von npt-spezifischen Primern über PCR bestätigt. Zur Infektion mit Nematoden werden die Stecklinge von transgenen Linien, die die Saccharoseisomerase 25 unter Kontrolle eines "Feeding cell"-spezifischen Promotors exprimieren, zuerst auf Medium mit Kanamycin angezogen und später in Töpfe mit steriler Erde transferiert. Die Pflanzen werden bei 22°C (16 h Tag/8 h Nacht) angezogen. Die Infektion der Pflanzen wird wie folgt durchgeführt: 3 ml einer Suspension 30 (ca. 500 J2-Larven) von Wurzelgallennematoden (Meloidogyne-Arten) werden direkt neben den Stengeln der Pflanzen in die Erde inokuliert. Die Pflanzen werden nach 2 bis 3 Wochen aus den Töpfen entfernt und die Wurzeln gewaschen. Anschließend wird die gesamte Wurzel einer jeden Pflanze mit Hilfe eines Stereo-35 mikroskop untersucht und die Anzahl der Gallen am Wurzelsystem von transgenen Pflanzen und Wildtyppflanzen verglichen.

Transgene Pflanzen, die die Saccharoseisomerase unter Kontrolle eines "Feeding cell"-spezifischen Promotors exprimieren, zeigen 40 eine deutliche Resistenz gegenüber endoparasitären Wurzel-nematoden. Die Anzahl der Gallen am Wurzelsystem dieser Pflanzen nach Nematodenbefall ist im Vergleich zu nicht-transformierten Pflanzen signifikant reduziert.

45 Beispiel 11: In vitro Nematodenresistenz-Test

Materialien:

Pflanzen: Kartoffel (*Solanum tuberosum* L. cv. Solara)

Nematoden: *Meloidogyne incognita*

Medium: modifiziertes Murashige & Skoog Medium (MSm; verfestigt

5 mit Agar) bestehend aus micro und 1/2 macro-Elementen einschließlich Vitaminen, Sucrose und Diachin-Agar (0,7%) pH 5,8.

10 Pflanzen: Sterile transgene Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum* L. cv. Solara transformiert mit pΔ0.3TobRB7-cwIso bzw. pLemmi9-cwIso) und entsprechende transgene Kontrollpflanzen (*Solanum tuberosum* L. cv. Solara transformiert mit pΔ0.3TobRB7-GUS bzw. pLemmi9-GUS) wurden in Gläsern mit jeweils mehreren Pflanzen 15 bereitgestellt. Ausgehend von jeder Pflanze wurden jeweils drei Linien mittels Stengelabschnitten und nachfolgender Kultivierung auf modifiziertem Murashige & Skoog Medium (MSm; verfestigt mit Agar) generiert. Jede Linie wurde auf einer separaten 9 cm Petri- 20 schale ausgepflanzt. Die Pflanzen wurden für 2 bis 3 Wochen unter einem Licht/Dunkel-Regim von 16h Licht / 8h Dunkelheit bei 25°C 25 gezüchtet.

Nematoden-Stammkultur:

Nematoden wurden aus sterilen Stammkulturen gewonnen. *M. incognita* wurde monoxenisch in der Dunkelheit bei 25°C auf Wurzelex- 25 plantaten von *Cucumis sativus* gezüchtet, wie bei Wyss et al. beschrieben (Wyss U et al. (1992) *Nematologica* 38:98-111). Eiersäcke wurden aus den Sterilkulturen gesammelt und auf einem Sieb in einem Glastrichter mit steriles Wasser plaziert. Die Trichter 30 wurden mit einem Plastikschlauch verbunden, welcher mit einer Klemme verschlossen wurde. Geschlüpfte Jungtiere wurden durch Öffnen der Klemme und Ablassen der Suspension in kleine Gefäße gewonnen. Die Viskosität der Suspension wurde durch Zufügen einer Suspension von steriles "Gel Rite" erhöht. Die Dichte der Nematoden in der Suspension wurde bestimmt und durch Zugabe von steriles Wasser normiert.

Nematodeninfektion

Sobald die Pflanzenwurzeln ein Wurzelsystem entwickelt hatten, 40 wurden die Wurzeln mit frisch geschlüpften Jungnematoden im zweiten Stadium (J2) infiziert. Zehn Tropfen mit jeweils 10 Jungtieren wurden dabei auf jede Pflanze appliziert.

Auswertung:

45 Nach 2 bis 3 Wochen hatten die Nematoden die Wurzeln penetriert und in den Kontrollpflanzen hatten sich Gallen gebildet. Gallenbildung wurde als Zeichen einer erfolgreichen Penetration und

61

Etablierung von Freßstellen in den Wurzeln herangezogen. Die Wurzeln der verschiedenen Pflanzenlinien wurden auf Gallen mikroskopisch untersucht und die Gallen auf der Petrischale vermerkt.

5 Im Vergleich zu den Kontrollpflanzen zeigen die mit pΔ0.3TobRB7-cwIso bzw. pLemmi9-cwIso transformierten Kartoffellinien eine signifikante Verringerung der Gallenbildung. Dies bedeutet eine signifikante Minderung der Nematoden-bedingten Schädigung.

10

15

20

25

30

35

40

45

Patentansprüche

1. Verfahren zum Erzielen oder Erhöhen der Resistenz gegen
5 mindestens ein Pathogen in pflanzlichen Organismen, wobei
nachfolgende Arbeitsschritte umfasst sind
 - a) transgene Expression eines Proteins mit Saccharoseisomerase Aktivität in einem pflanzlichen Organismus oder
10 Gewebe, Organ, Teil oder Zelle desselben, und
 - b) Auswahl der pflanzlichen Organismen, bei denen
- im Unterschied oder Vergleich zum Ausgangsorganismus -
die Resistenz gegen mindestens ein Pathogen besteht
15 oder erhöht ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Saccharose-Isomerase
beschrieben wird durch
 - i) ein Protein gemäß SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18
oder 36, oder
20
 - ii) ein funktionelles Äquivalent zu einem Protein gemäß
SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 oder 36, oder
25
 - iii) ein funktionell äquivalentes Fragment zu einem Protein
gemäß i) und ii).
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei die
30 Expression der Saccharoseisomerase gewährleistet wird durch
eine transgene Expressionskassette umfassend mindestens eine
Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
 - a) Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Aminosäuresequenz
35 gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22
oder 36, und
 - b) Nukleinsäuresequenzen kodierend für Proteine mit einer
40 Homologie von mindestens 40% zu der Sequenz gemäß
SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 oder 26
aufweisen, und
 - c) Nukleinsäuresequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11,
45 13, 15, 17, 19, 21 oder 35, und

- d) Nukleinsäuresequenzen, die zu einer Nukleinsäuresequenz von c) degeneriert ist, und
- e) Nukleinsäuresequenzen, die eine Homologie von mindestens 40% zu einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 oder 35 aufweisen, und
- f) Nukleinsäuresequenzen, die mit einem komplementären Strang der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 oder 35 hybridisieren.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Saccharose-Isomerase unter Kontrolle eines in Pflanzen funktionellen pathogen-induzierbaren oder gewebespezifischen Promotors exprimiert wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Pathogen ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Pilzen und Nematoden.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Pathogen ausgewählt ist aus der Gruppe der Pilze bestehend aus Plasmodiophoromycota, Oomycota, Ascomycota, Chytridiomyceten, Zygomyceten, Basidiomycota und Deuteromyceten.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Pflanze ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Kartoffel, Rübe, Zuckerrübe, Tomate, Banane, Karotte, Zuckerrohr, Erdbeere, Ananas, Papaya, Soja, Hafer, Gerste, Weizen, Roggen, Triticale, Hirse und Mais.

8. Transgene Expressionskassette enthalten in funktioneller Verknüpfung mit einem in Pflanzen funktionellen pathogen-induzierbaren oder epidermis-spezifischen Promotor eine Nukleinsäuresequenz kodieren für eine Saccharose-Isomerase.

9. Transgene Expressionskassette nach Anspruch 8, wobei die Saccharoseisomerase wie in einem der Ansprüche 2 oder 3 definiert ist.

10. Transgene Expressionskassette nach Anspruch 8 oder 9, wobei der pathogen-induzierbare oder epidermis-spezifische Promotor ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 23, 24, 32, 33 oder 34.

11. Transgener Expressionsvektor enthaltend eine transgene Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10.
12. Transgener Organismus enthaltend eine transgene Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10 oder einen transgenen Expressionsvektor gemäß Anspruch 11.
13. Transgener Organismus nach Anspruch 12, ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzen bestehend aus Kartoffel, Rübe, Zucker-
10 rübe, Tomate, Banane, Karotte, Zuckerrohr, Erdbeere, Ananas, Papaya, Soja, Hafer, Gerste, Weizen, Roggen, Triticale, Hirse und Mais.
14. Transgene Ernteprodukte, Vermehrungsmaterial, Zellen, Organe, Teile, Kalli, Zellkulturen, Samen, Knollen, Stecklinge oder transgene Nachkommen eines transgenen Organismus gemäß einem der Ansprüche 12 bis 13.
15. Verwendung eines transgenen Organismus nach einem der Ansprüche 12 bis 13 oder von diesem angeleitete transgene Ernteprodukte, Vermehrungsmaterial, Zellen, Organe, Teile, Kalli, Zellkulturen, Samen, Knollen, Stecklinge oder transgene Nachkommen nach Anspruch 14 zur Herstellung von Palatinose.

25

30

35

40

45

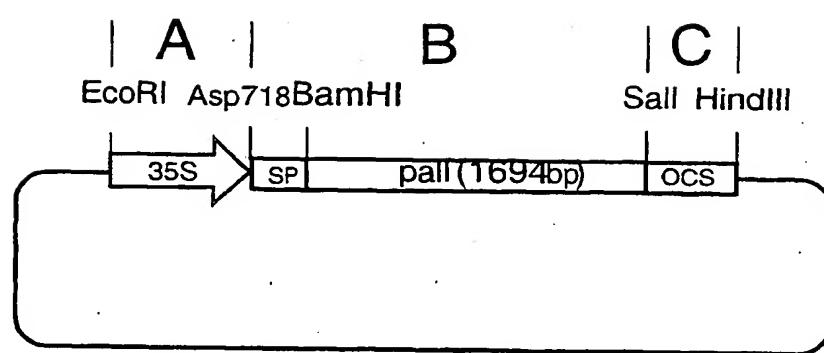


Fig.1

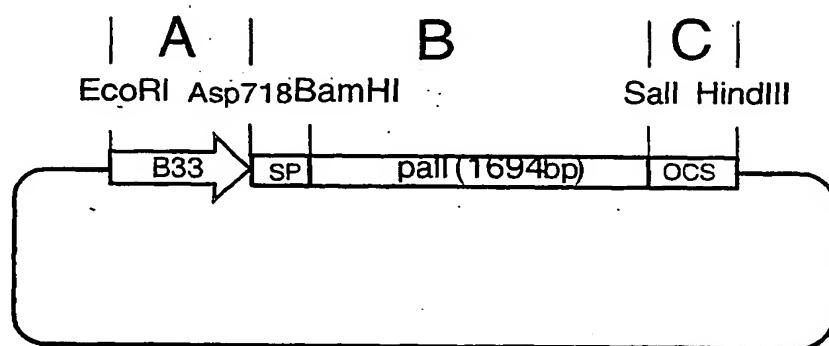


Fig.2